

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION D'UN NOUVEAU
PARTENAIRE PROTÉIQUE POUR LES RÉCEPTEURS DES HORMONES
THYROÏDIENNES**

PAR

GENEVIÈVE HAMANN

PROGRAMME DE PHYSIOLOGIE (ENDOCRINOLOGIE)

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À LA FACULTÉ DE MÉDECINE

EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE

MAÎTRE ÈS SCIENCES (M.Sc.)

MAI 2002



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-74399-3

Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	III
LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES.....	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	IX
RÉSUMÉ.....	XI
I. INTRODUCTION.....	1
1. PHYSIOLOGIE DES HORMONES THYROÏDIENNES.....	1
1.1 Importance des hormones thyroïdiennes.....	1
1.2 Glande thyroïde et synthèse des hormones thyroïdiennes.....	2
1.3 Contrôle de la sécrétion des hormones thyroïdiennes.....	6
2. MÉCANISMES D’ACTION DES HORMONES THYROÏDIENNES.....	8
2.1 Actions non-génomiques des hormones thyroïdiennes.....	8
2.1.1 Effets mitochondriaux.....	9
2.1.2 Actions sur le système nerveux central.....	10
2.1.3 Hormones thyroïdiennes et voies de transduction.....	12
2.2 Actions génomiques des hormones thyroïdiennes.....	13
2.2.1 Récepteurs nucléaires.....	13
2.2.2 Éléments de réponse (TREs).....	15
2.2.3 Isoformes des TRs.....	17
2.2.4 Domaines fonctionnels des TRs.....	18
2.2.5 Mécanismes de régulation positive.....	25
2.2.6 Importance des corégulateurs.....	26
2.2.7 Mécanismes de régulation négative.....	31

3. INITIATION DU PROJET DE MAÎTRISE.....	33
4. ÉTATS DES CONNAISSANCES SUR GRP1.....	33
4.1 ARFs.....	33
4.2 Facteurs d'échange nucléotidique.....	34
4.3 GRP1, avenues possibles.....	40
II. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE.....	42
III. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	44
1. CRIBLAGE DOUBLE-HYBRIDE.....	44
1.1 Principe du criblage double-hybride.....	44
1.2 Construction des plasmides.....	46
1.3 Transformation des levures.....	48
1.4 Essai β -galactosidase sur filtre.....	49
2. ISOLATION DE GRP1 PAR RT-PCR.....	50
2.1 Extraction d'ARN à l'aide du réactif de TRIzol.....	50
2.2 Réaction de transcription inverse.....	50
2.3 Amplification par PCR.....	51
3. CONSTRUCTIONS.....	53
3.1 GRP1 complet dans pSG5.....	53
3.2 GRP1 complet dans pGEX-4T2.....	54
3.3 GRP1 (CC-Sec7) dans pSG5.....	54
3.4 GRP1 (CC) dans pGEX-4T2.....	55
3.5 GRP1 (PH) dans pGEX-4T2.....	55

4. ESSAIS D'INTERACTION PROTÉINE-PROTÉINE.....	56
4.1 Principe de l'essai.....	56
4.2 Protéines marquées radioactivement.....	56
4.3 Protéines GST.....	58
4.4 Essai d'interaction par « GST pull-down ».....	60
5. EXPRESSION TISSULAIRE ET CELLULAIRE	61
5.1 Préparation de la sonde	61
5.2 Hybridation du « Dot Blot ».....	62
5.3 Buvarbage de type Northern.....	62
6. ESSAIS TRANSCRIPTIONNELS.....	63
6.1 Construction des plasmides utilisés.....	63
6.2 Culture cellulaire et transfection.....	64
6.3 Essai transcriptionnel.....	65
7. ESSAI PAR RÉTENTION SUR GEL.....	65
7.1 Préparation de la sonde.....	68
7.2 Préparation des protéines.....	68
7.3 Essai par rétention sur gel.....	69
IV. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS.....	70
1. CRIBLAGE DOUBLE-HYBRIDE.....	70
2. ISOLATION DE GRP1.....	72
3. ESSAIS D'INTERACTION.....	73
3.1 GRP1 reconnaît le domaine de liaison à l'ADN de TR β 2.....	73
3.2 La région carboxy-terminale de GRP1 est reconnue par les TRs.....	75

3.3	Influence du ligand dans l'interaction GRP1-TR.....	78
4.	EXPRESSION TISSULAIRE ET CELLULAIRE DE GRP1.....	80
5.	ESSAIS TRANSCRIPTIONNELS.....	83
5.1	Effet de GRP1 sur les pTREs.....	83
5.2	Effet de GRP1 sur les nTREs.....	85
5.3	Courbe dose-réponse de l'effet transcriptionnel de GRP1.....	87
6.	EFFET DE GRP1 SUR L'INTERACTION ENTRE LES TRs ET LES TREs.....	91
7.	ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DE LA VOIE DE LA PI3K.....	91
V.	DISCUSSION.....	95
1.	CARACTÉRISATION DE L'INTERACTION ENTRE GRP1 ET LES TRs	95
2.	EXPRESSION CELLULAIRE ET TISSULAIRE DE GRP1.....	104
3.	EFFET DE GRP1 SUR L'ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DES TRs.....	105
4.	HYPOTHÈSE GÉNÉRALES.....	106
VI.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	110
VII.	REMERCIEMENTS.....	112
VIII.	RÉFÉRENCES.....	113

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

TABLEAU 1. Représentation schématique des principaux TREs.....	16
TABLEAU 2. Séquences des amorces utilisées.....	52
FIGURE 1. Anatomie de la glande thyroïde.....	3
FIGURE 2. Structure biochimique des principales HTs.....	4
FIGURE 3. Axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien.....	7
FIGURE 4. Les récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes.....	19
FIGURE 5. Structure du domaine de liaison à l'ADN.....	21
FIGURE 6. Structure du domaine de liaison du ligand de TR α 1.....	24
FIGURE 7. Principaux corégulateurs connus.....	28
FIGURE 8. Mécanisme de régulation positive.....	30
FIGURE 9. Domaines structuraux de la famille des cytohésines.....	36
FIGURE 10. Modèle de translocation de GRP1 à la membrane plasmique.....	39
FIGURE 11. Criblage double-hybride.....	45
FIGURE 12. Vecteurs utilisés pour le criblage double-hybride.....	47
FIGURE 13. Représentation schématique de l'essai « GST pull-down ».....	57
FIGURE 14. Représentation schématique de l'essai transcriptionnel.....	66
FIGURE 15. Représentation schématique de l'essai par rétention sur gel.....	67
FIGURE 16. La liaison entre GRP1 et TR β 2 se fait sur le DBD du récepteur.....	74
FIGURE 17. GRP1 reconnaît d'autres récepteurs nucléaires.....	76
FIGURE 18. Localisation des sites d'interaction entre TR β 2 et GRP1.....	77

FIGURE 19. La liaison TR β 2-GRP1 est indépendante de la liaison du ligand.....	79
FIGURE 20. Expression de GRP1 dans les tissus et lignées cellulaires humaines.....	81
FIGURE 21. Expression de GRP1 dans des lignées cellulaires.....	82
FIGURE 22. Effet de GRP1 sur l'activité des TRs sur le pTRE TRETk.....	84
FIGURE 23. Effet de GRP1 sur l'activité des TRs sur le pTRE LYSX2.....	86
FIGURE 24. Effet de GRP1 sur l'activité des TRs sur le nTRE TRH.....	88
FIGURE 25. Effet de GRP1 sur l'activité des TRs sur le nTRE TSH α	89
FIGURE 26. Effet d'une concentration croissante de GRP1 sur l'activité de TR β 1.....	90
FIGURE 27. Diminution de l'homodimère TR-TR sur DR+4 en présence de GRP1...	92
FIGURE 28. Étude préliminaire de la voie PI3K.....	94
FIGURE 29. Modèle de translocation des TRs à la membrane plasmique.....	101

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ANT	Adenine nucleotide translocase
AD	Domaine d'activation
ARF	ADP ribosylation factor
ARNO	ARF nucleotide-binding-site opener
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DR	Répétition directe
EMSA	Electromobility shift assay (essai par rétention sur gel)
eNOS	Oxyde nitrique synthase endothéliale
ER	Récepteur des oestrogènes
FSH	Follicle stimulating hormone
GEF	Facteur d'échange nucléotidique
GFP	Green fluorescent protein
GRP1	General receptor for phosphoinositide 1
GST	Glutathione-S-transférase
HAT	Histone acetyl transférase
HDAC	Histone déacétylase
HSP	Heat shock protein
HT	Hormone thyroïdienne
LBD	Domaine de liaison du ligand
LH	Luteinizing hormone
NCoR	Nuclear receptor corepressor
PBS	Solution phosphate saline
PI3K	Phosphoinositol-3 kinase
PH	Pleckstrin homology domain
PPAR	Peroxisome proliferator activating receptor
RAR	Récepteur de l'acide rétinoïque
RN	Récepteur nucléaire
RT	Réaction de transcription inverse

RXR	Récepteur de l'acide 9-cis rétinique
SMRT	Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor
SNC	Système nerveux central
SRC	Steroid receptor coactivator
T₃	3,3',5'-Triiodothyronine
T₄	3,3',5,5'-Tétraiodothyronine ou thyroxine
TBG	Thyroxin binding globulin
TFIIB	Transcription factor IIB
TR	Récepteur des hormones thyroïdiennes
TRE	Élément de réponse aux hormones thyroïdiennes
TRH	Thyrotropin releasing hormone
TSH	Thyroid stimulating hormone
UAS	Site d'activation en aval
UV	Ultraviolet
VDR	Récepteur de la vitamine D

RÉSUMÉ

Les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TRs) sont des facteurs de transcription qui contrôlent l'expression de plusieurs gènes cibles en se liant à une séquence consensus localisée dans la région promotrice. Ce mécanisme d'action génomique a été grandement étudié depuis le milieu des années 1980 et explique la plupart des actions des hormones thyroïdiennes (HTs). Par ailleurs, on dénote également des réponses cellulaires très rapides suite à une exposition aux HTs, ce qui suggère l'existence de voies de signalisation parallèles, soit non génomiques. Afin d'acquérir une meilleure compréhension du mécanisme d'action de ces hormones, nous avons criblé une librairie d'ADNc de cerveau fœtal humain avec la méthode double-hybride chez la levure et nous avons identifié de nouveaux partenaires protéiques aux TRs, dont GRP1 (*general receptor for phosphoinositide1*). Cette dernière est un facteur d'échange nucléotidique pour ARF, une petite protéine G impliquée entre autres dans l'assemblage de vésicules et le réarrangement du cytosquelette d'actine.

La caractérisation initiale de cette nouvelle interaction est l'objectif de cette étude. Nous avons montré par des essais d'interaction « GST pull-down » que i) le domaine de liaison à l'ADN du récepteur est impliqué dans l'interaction, ii) les TRs reconnaissent fortement la région carboxy-terminale de GRP1, iii) GRP1 se lie à toutes les isoformes des TRs en plus du récepteur des œstrogènes et iv) la liaison des deux protéines semble indépendante de la présence du ligand. Nous avons également

observé que GRP1 entraîne une diminution globale de l'activité transcriptionnelle de toutes les isoformes des TRs, en régulation positive et négative. La liaison de l'homodimère TR-TR sur l'ADN est aussi diminuée en présence de ce nouveau partenaire protéique. Ces résultats suggèrent que GRP1 empêche la liaison des TRs à l'ADN et plusieurs hypothèses sont possibles quant aux rôles physiologiques de cette séquestration, telle l'implication de GRP1 dans le réarrangement du cytosquelette d'actine pouvant être engendré par les hormones thyroïdiennes.

I. INTRODUCTION

1. PHYSIOLOGIE DES HORMONES THYROÏDIENNES

1.1 IMPORTANCE DES HORMONES THYROÏDIENNES

Les hormones thyroïdiennes (HTs) sont de petites molécules essentielles au bon fonctionnement de l'organisme et qui ont pour cible un très grand nombre de tissus. Un peu plus de 10% de la population sera affectée au cours de leur vie par un dérèglement de leur fonction thyroïdienne (Greenspan, 1997). Bien que de façon générale il soit relativement aisé de contrôler la concentration sanguine de ces hormones, certaines pathologies, telle la résistance aux hormones thyroïdiennes, demandent une connaissance approfondie de leurs mécanismes d'action moléculaire. Depuis la découverte en 1986 des récepteurs des hormones thyroïdiennes (TRs) (Weinberger et al., 1986); (Sap et al., 1986), de nombreuses études ont été effectuées et leur mécanisme d'action est aujourd'hui beaucoup plus clair. Cependant, plusieurs aspects demeurent toujours nébuleux ou inexpliqués, d'où l'importance de poursuivre les travaux dans ce domaine.

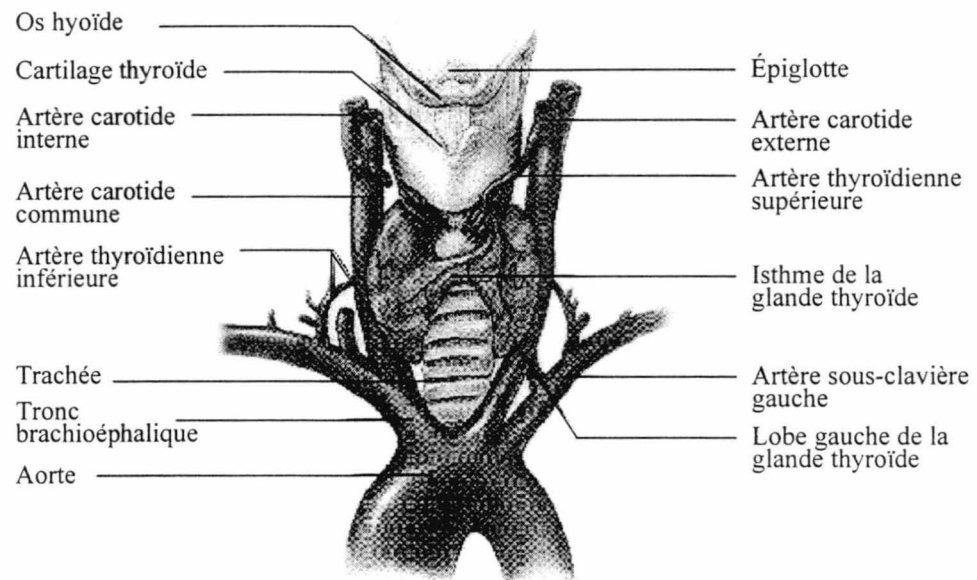
Les effets physiologiques des HTs sont très variés. Impliquées entre autres dans la croissance des os et le développement du système nerveux central, une absence totale d'HTs durant l'embryogénèse entraîne une grave maladie appelée crétinisme : on observe chez ces patients un retard de croissance sévère et une arriération mentale

importante (Idelman, 1995). Au niveau du cerveau, la déficience en HTs est associée avec des problèmes de myélinisation, de croissance neuritique et d'embranchements neuronaux ainsi que des changements dans la composition cellulaire de certaines structures, telles l'hypocampe et le néocortex (Motomura and Brent, 1998). Par ailleurs, l'action des HTs chez l'adulte s'observe surtout par son rôle au niveau du maintien du métabolisme basal. Elles favorisent entre autres l'entrée du glucose dans les cellules, la consommation d'oxygène par les mitochondries ainsi que le métabolisme lipidique et protéique. Les HTs influencent également les activités cardiaques, gastro-intestinales et la thermorégulation de façon directe ou *via* le système β -adrénergique (Yen, 2001; Motomura and Brent, 1998).

1.2 GLANDE THYROÏDE ET SYNTHÈSE D'HORMONES THYROÏDIENNES

La glande thyroïde est située dans la partie antérieure du cou et est composée de deux lobes reliés par un isthme (figure 1a). Les principales hormones produites et sécrétées par la thyroïde sont la 3,5,3'-triiodothyronine (T_3) et la 3,5,3',5'-tétraiodothyronine (thyroxine ou T_4) (figure 2). Au niveau histologique, on observe dans la partie glandulaire de la thyroïde, des follicules formés d'une seule couche de cellules spécialisées. Au centre de chaque follicule on retrouve le colloïde, substance composée essentiellement de thyroglobuline, et en périphérie, les cellules folliculaires ou principales (figure 1b). La glande thyroïde sécrète également de la calcitonine, produite par les cellules C localisées entre les follicules.

a)



b)

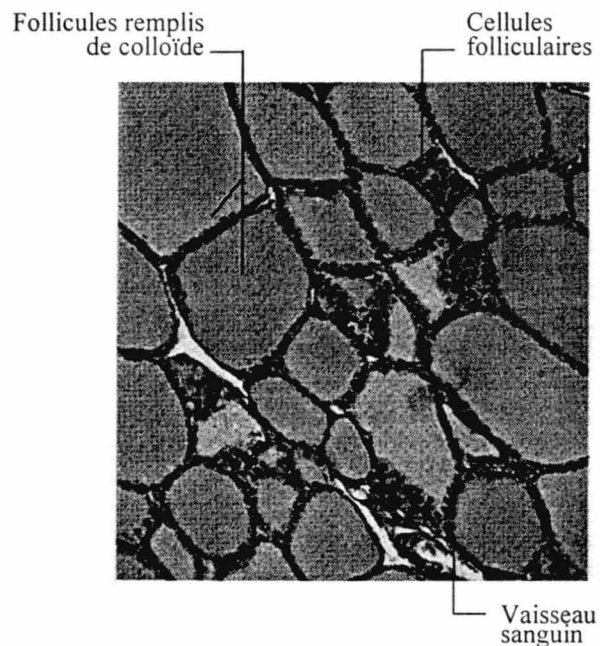
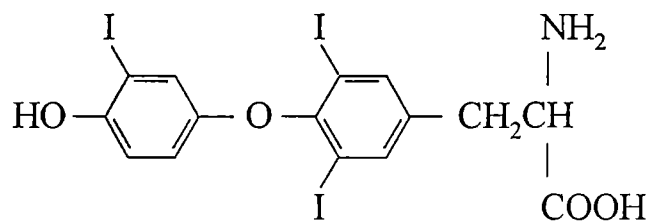
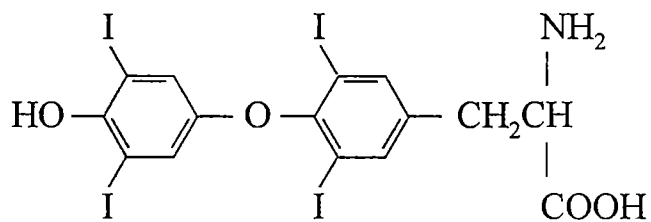


Figure 1. Anatomie macroscopique et microscopique de la glande thyroïde. a) La glande thyroïde est localisée dans la partie antérieure du cou dans une région très vascularisée. b) La thyroïde est composée de plusieurs follicules constitués d'un colloïde central entouré de cellules folliculaires. Tiré et adapté de Marieb, 1998.



3,3'-Triiodo-L-Thyronine (T_3)



Thyroxine (T_4)

Figure 2. Structure biochimique des principales hormones thyroïdiennes.

La T_4 est retrouvée à 90% dans la circulation sanguine, mais la T_3 a dix fois plus d'affinité pour le récepteur des hormones thyroïdiennes.

La thyroïde est parfois appelée « pompe à iode » ou « piège à iode » car elle peut capter jusqu'à un tiers de l'iode absorbé quotidiennement (Idelman, 1995). Les ions iodure (I^-) entrent d'abord dans la cellule par un symport Na^+/I^- et sont ensuite oxydés (Dai et al., 1996). Par la suite, l'iode est fixé sur les groupements tyrosiniques de la thyroglobuline pour former la monotyrosine (MIT) ou la diiodotyrosine (DIT). Les protéines iodées sont transportées au colloïde où elles sont emmagasinées. Le couplage de MIT et DIT formera par condensation la T_3 et la T_4 , toujours reliées à la thyroglobuline. Lors d'un signal de sécrétion, il y aura d'abord endocytose de la protéine iodée, fusion des endosomes avec des vésicules lysosomiales, séparation enzymatique des HTs et de la thyroglobuline et finalement, diffusion des HTs dans la circulation sanguine.

La concentration sérique de T_4 représente plus de 90% des HTs circulantes, soit 103 nM, comparativement à 1,84 nM pour la T_3 (Greenspan, 1997). Ces hormones étant de très petite taille et liposolubles, leur transport est favorisé par la liaison de protéines transporteuses, telles la TBG (*thyroxin binding globulin*) qui possède une affinité dix fois plus grande pour la T_4 que la T_3 . La thyroxine pré-albumine et l'albumine participent également au transport de ces hormones. Par ailleurs, la T_3 ayant pour sa part une plus grande affinité pour le récepteur nucléaire des hormones thyroïdiennes que la T_4 , cette dernière est mono-désiodée dans les tissus périphériques pour permettre une réponse efficace aux HTs par une régulation de l'expression génique. La thyroxine est donc une prohormone constituant un réservoir d'HTs.

1.3 CONTRÔLE DE LA SÉCRÉTION DES HORMONES THYROÏDIENNES

L'homéostasie est l'objectif ultime des organismes vivants. Le système endocrinien est la plupart du temps responsable du maintien de l'homéostasie. Plusieurs glandes (thyroïde, surrénales, gonades) étant elles-mêmes finement contrôlées par des composantes du système nerveux central (SNC) : l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'hypothalamus, localisé à la base du cerveau, est constitué de noyaux spécifiques qui captent et analysent les informations reçues par le SNC. En réponse à ces stimuli, ils produisent et sécrètent des facteurs de libération qui sont relâchés au niveau des capillaires du système porte reliant l'hypothalamus à l'adénohypophyse. Cette dernière est constituée de plusieurs types cellulaires qui répondent différemment aux facteurs de libération en sécrétant des hormones qui rejoindront la circulation systémique vers des cibles périphériques.

L'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien répond à ces règles (Greenspan, 1997) (figure 3). Le facteur de libération hypothalamique est un petit peptide de trois acides aminés appelé TRH (*thyrotropin releasing hormone*) produit par le noyau arqué. Cette hormone intervient dans la stimulation de la sécrétion et de la synthèse de la thyrotropine (TSH) *via* ses récepteurs couplés à une protéine G, TRHR-1 et TRHR-2, exprimés au niveau des cellules thyrotropes de l'adénohypophyse. Le récepteur TRHR-2, récemment identifié, est également exprimé dans certaines régions du SNC et ses fonctions ne sont pas

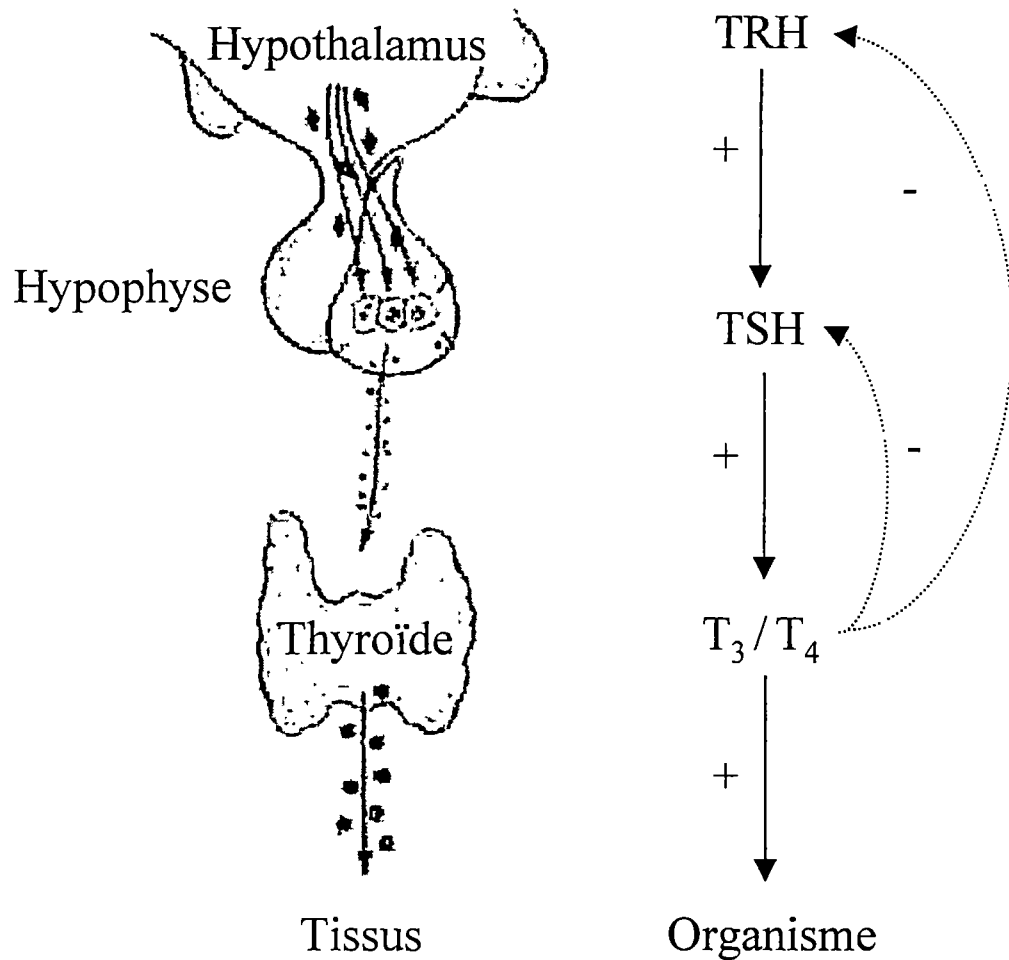


Figure 3. Axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien. La synthèse et relâche d'hormones thyroïdiennes sont contrôlées par les hormones TRH et TSH de l'hypothalamus et de l'hypophyse. Ces hormones sont elles-mêmes contrôlées par les hormone thyroïdiennes par un mécanisme de rétro-inhibition. Tiré de Marieb, 1998.

encore élucidées (O'Dowd et al., 2000). La thyrotropine est une glycoprotéine composée d'une sous-unité α , commune aux hormones FSH et LH, et d'une sous-unité β , spécifique à la TSH. La TSH rejoint, *via* la circulation sanguine, les cellules principales de la glande thyroïde où elle se lie à un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G. Cette action AMPc-dépendante favorise entre autres la fixation de l'iode sur la thyroglobuline et active les enzymes responsables du clivage de la thyroglobuline iodée, en plus de stimuler la croissance de la glande. Ces actions augmentent ainsi la synthèse et la sécrétion des HTs. Afin d'assurer une concentration systémique constante, les HTs s'auto-inhibent dans une boucle de rétrocontrôle. Une élévation de la concentration en HTs entraîne donc une diminution de la synthèse et de la sécrétion à la fois de TRH et de TSH, conservant ainsi l'équilibre hormonal.

2. MÉCANISMES D'ACTION DES HORMONES THYROÏDIENNES

2.1 ACTIONS NON-GÉNOMIQUES DES HORMONES THYROÏDIENNES

Les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TRs) font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires. Il existe également certaines évidences quant à la présence d'un récepteur membranaire des HTs, bien que son isolement n'ait pas encore été accompli (Samson et al., 1993). L'action des TRs est principalement génomique et implique la synthèse de protéines *de novo*, un processus qui nécessite quelques heures. Cependant, suite à une exposition aux HTs, des effets beaucoup plus rapides

également observés, laissant suggérer un mécanisme d'action parallèle, soit non-génomique. Autrefois délaissées par la communauté scientifique, certaines de ces actions sont maintenant reconnues et démontrées, quoique les mécanismes les régissant demeurent souvent inexpliqués. Des fonctions aussi variées que la régulation de la morphologie cellulaire, le tonus vasculaire et l'homéostasie ionique seraient associées à des actions non-génomiques des HTs (Davis and Davis, 1996). Il est également connu depuis de nombreuses années que celles-ci augmentent l'entrée de glucose dans plusieurs tissus par un mécanisme qui impliquerait une adénylate cyclase (Segal and Ingbar, 1989) et qui pourrait être dépendant du Ca^{2+} (Segal and Ingbar, 1989) et de la calmoduline (Segal et al., 1986).

2.1.1 EFFETS MITOCHONDRIAUX

L'action des HTs sur les mitochondries est connue depuis longtemps. À la fin des années 1970s, on observait déjà que les HTs augmentaient rapidement la consommation d'oxygène et la phosphorylation oxydative par des mitochondries isolées (Wrutniak-Cabello et al., 2001). La protéine mitochondriale ANT (*adenine nucleotide translocase*) a été soupçonnée d'être la cible directe des HTs. Stimulée rapidement par la T_3 , des chercheurs ont même démontré que l'ANT possédait un site de liaison de haute affinité pour l'hormone (Sterling and Brenner, 1995). Cependant, ces résultats n'ont pu être reproduits et cette hypothèse demeure controversée. La nouvelle protéine mitochondriale p43, possédant une homologie partielle avec $\text{TR}\alpha 1$, a également été décrite comme interagissant directement avec l'ADN mitochondrial

(Wrutniak et al., 1995). La mitochondrie posséderait ainsi ses propres systèmes répondants aux HTs. Une action non-génomique rapide a été observée, mais également une action génomique, effectuée par des récepteurs mitochondriaux semblables, mais non entièrement homologues aux TRs classiques.

2.1.2 ACTIONS SUR LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

Les hormones thyroïdiennes sont essentielles pour le développement normal du système nerveux central et c'est dans sur ce tissu que leurs actions non-génomiques ont été les mieux décrites. Bien que les récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes soient présents dans le cerveau en développement, plusieurs évidences suggèrent que la régulation génique ne peut expliquer toutes les observations faites suite à l'exposition aux HTs. Il a d'abord été montré que les HTs pouvaient réguler la polymérisation de l'actine et par le fait même, l'organisation des microfilaments (Leonard and Farwell, 1997). Il existe deux formes d'actine : l'actine monomérique ou globulaire, et l'actine polymérisée ou filamenteuse. Dans les astrocytes en culture, 90% de l'actine est polymérisée et est organisée de deux façons : les fibres de stress transcellulaires ainsi qu'un réseau d'actine cortical, localisé sous la membrane (Leonard and Farwell, 1997). L'absence d'HTs dans ces cellules entraîne la disparition des fibres de stress et seule la thyroxine (T_4), et non la T_3 , peut rapidement rétablir ce réseau d'actine (Siegrist-Kaiser et al., 1990). De plus, ni la cycloheximide ou l'actinomycine D, deux inhibiteurs de la transcription, n'affectent pas cette augmentation de la polymérisation d'actine par la T_4 , suggérant que cette action

n'implique pas une régulation génique par les TRs. L'action des HTs est également observable sur l'assemblage et la stabilisation des microtubules, entre autres par une régulation des « *microtubule-associated proteins* » (MAPs) (Benjamin et al., 1988; Aniello et al., 1991). Quelques études suggèrent cependant que ces actions soient à la fois génomique, par la régulation de l'expression du gène de la tubuline par exemple, ainsi que par des mécanismes non-génomiques inconnus (Nunez et al., 1991; Charriere-Bertrand and Nunez, 1992; Lorenzo et al., 2002).

Par ailleurs, on sait qu'une hypothyroïdie sévère lors du développement du cerveau entraîne d'importantes altérations morphologiques, qui résultent entre autres en une mauvaise migration neuronale et à des projections axonales déficientes (Leonard and Farwell, 1997). Le lien entre ces effets observés et la T₄ serait au niveau de la modulation des signaux de guidage provenant de la matrice extracellulaire. Par exemple, on peut observer l'attachement des astrocytes à la laminine, une composante de la matrice extracellulaire, suite à un traitement à la T₄ et non à la T₃ (Farwell et al., 1995). Cet attachement peut être éliminé d'une part en bloquant les sites de reconnaissance des intégrines et d'autre part, en utilisant un agent qui dépolymérise les microfilaments d'actine. On peut également constater la présence de points focaux d'adhésion dans les cellules traitées à la T₄ et non celles traitées à la T₃. Bref, tous ces résultats suggèrent fortement que la thyroxine puisse réguler l'interaction entre les intégrines et la matrice extracellulaire en modulant l'organisation des microfilaments d'actine. Plusieurs autres exemples des effets des HTs sur le SNC appuient

l'hypothèse qu'il existe certainement une synergie entre les actions génomiques et non-génomiques de ces molécules dans ce système.

2.1.3 HORMONES THYROÏDIENNES ET VOIES DE TRANSDUCTION

Depuis quelque temps, on remarque une convergence entre les différentes voies de transduction par la description d'interactions surprenantes. Sans mener nécessairement à une action non-génomique des hormones thyroïdiennes, ces nouvelles interactions décrivent bien l'élargissement des fonctions et des modes de régulation des récepteurs nucléaires. Un exemple intéressant est celui de la liaison entre le récepteur nucléaire des œstrogènes (ER α) et la sous-unité régulatrice p85 α de l'enzyme PI3Kinase (Simoncini et al., 2000). La stimulation cellulaire aux œstrogènes augmente l'activité de la PI3K associée à ER α et entraîne l'activation de la protéine kinase B/Akt ainsi que celle de la synthase endothéliale du monoxyde d'azote (eNOS). Dans cet article, les auteurs ont également vérifié l'interaction avec d'autres récepteurs nucléaires et il est très intéressant de noter qu'une stimulation aux HTs entraîne la liaison du TR et la stimulation de la PI3K. Cette activité n'est pas généralisée, puisque tous les RNs étudiés ne stimulent pas cette action.

D'autres observations intéressantes ont récemment été décrites. Par exemple, la thyroxine induit rapidement l'activation et la translocation des MAPKs dans des cellules en culture (Lin et al., 1999). De plus, l'utilisation de la T₄-agarose, incapable de pénétrer la cellule, suggère que cette activation se ferait *via* une stimulation

membranaire, par un mécanisme sensible à la toxine de pertussis et qui impliquerait ainsi un récepteur couplé à une protéine G, de type Gi. Dans un article subséquent, le même groupe démontre que les MAPKs, activées par la thyroxine, s'associent aux récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes et les phosphorylent au niveau de leur domaine de liaison à l'ADN (Davis et al., 2000). On montre également la dissociation du TR et du corépresseur SMRT suite à cette phosphorylation. D'autres articles du même groupe montrent la phosphorylation de STAT1 α (Lin et al., 1999) et de p53 (Shih et al., 2001) suite à une stimulation à la thyroxine. Bref, les rôles physiologiques exacts de ces nouvelles associations et phosphorylations n'ont pas encore élucidés, mais tous ces mécanismes démontrent bien l'ampleur de l'action des hormones thyroïdiennes.

2.2 ACTIONS GÉNOMIQUES DES HORMONES THYROÏDIENNES

2.2.1 RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription qui possèdent cette fascinante particularité de se lier à l'ADN et de réguler, avec l'aide de protéines accessoires, la transcription de gènes cibles. Cette superfamille de récepteurs comporte plus d'une centaine de membres qu'on peut diviser en trois groupes majeurs. D'abord les récepteurs de classe I, dits classiques ou stéroïdiens, ont la particularité de lier des protéines de chocs thermiques (HSP) en absence de leur ligand. Cette liaison les empêche de lier l'ADN et leur permet de rester dans le

cytoplasme, ou dans le noyau dans le cas du récepteur des œstrogènes (Taylor and Al-Azzawi, 2000). Ils sont donc transcriptionnellement inactifs en absence d'hormone. La formation du complexe avec les HSPs a une double fonction : présenter la poche hydrophobe du récepteur pour favoriser la liaison du ligand et dans certains cas, contribuer à la translocation du récepteur au noyau (Pratt and Toft, 1997). La liaison du ligand entraîne un changement conformationnel libérant les HSPs et permettant la localisation du récepteur à un site de reconnaissance sur l'ADN. Ainsi, les récepteurs de classe I ne peuvent qu'activer la transcription de gènes cibles en présence de leur ligand. Les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR), de l'acide rétinoïque (RAR), de l'acide *9-cis* rétinoïque (RXR) et de la vitamine D (VDR) font tous partie des récepteurs nucléaires de classe II. Ceux-ci sont liés de façon constitutive à l'ADN et ont ainsi la possibilité de réprimer ou d'activer la transcription selon la présence ou non de leur ligand. Finalement, il existe plusieurs récepteurs « orphelins » qui constituent le dernier groupe de cette famille. Ces derniers ont été identifiés par homologie de structures avec les autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires, sans que leur ligand soit préalablement reconnu. Selon leur caractéristiques, ils peuvent également être intégrés dans les classes I et II des récepteurs nucléaires. On retrouve entre autres dans cette catégorie le récepteur PPAR (*peroxysome proliferator activated receptor*), qui serait impliqué dans la voie de signalisation de l'insuline.

2.2.2 ÉLÉMENTS DE RÉPONSE (TREs)

Un élément essentiel qui amène une grande spécificité de la réponse des RNs est la séquence consensus reconnue sur l'ADN, appelée élément de réponse. Localisés dans la région promotrice des gènes cibles, les éléments de réponse aux hormones thyroïdiennes (TREs) sont composés généralement de deux demi-sites consensus; chaque demi-site étant reconnu par un partenaire d'un complexe dimérique. L'étude des régions promotrices des gènes régulés par les HTs suggère les nucléotides (G/A)GGT(C/G)A comme étant la séquence privilégiée reconnue par les TRs (Yen, 2001). Des variations dans la séquence primaire, l'espacement et l'orientation des demi-sites amènent une grande diversité de TREs. Environ 30 TREs naturels ont d'ailleurs été décrits dans la littérature, les plus fréquents étant les répétitions directes, suivis des palindromes inversés et les palindromes simples (Tableau 1). D'ailleurs, il est intéressant de noter l'importance de l'espacement dans le cas de répétitions directes : un espacement de 3, 4 et 5 nucléotides favoriseront respectivement la liaison de récepteurs de la vitamine D, des TRs et des RARs (Glass, 1996). Par ailleurs, la liaison du TR à un partenaire de dimérisation influence également la reconnaissance et l'orientation du complexe sur l'ADN. Bref, la séquence d'ADN reconnue par les TRs est le premier élément clé dans la spécificité de la réponse aux HTs.

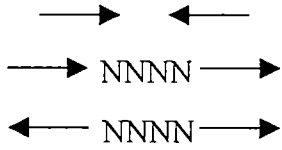

TREs	AGENCEMENT
TRE positifs Palindrome (TREpal) Répétition directe (DR) Palindrome inversé (IP)	
TRE négatifs Monomérique Répétition inversée (IR)	

Tableau 1. Représentation schématique des principaux éléments de réponses aux hormones thyroïdiennes (TREs). Les demi-sites consensus AGGTCA sont représentés par les flèches et les nucléotides, par des N.

2.2.3 ISOFORMES DES TRS

Deux études indépendantes ont identifié en 1986 les premiers récepteurs des hormones thyroïdiennes, un chez le poulet et l'autre chez l'humain (Sap et al., 1986); (Weinberger et al., 1986). Plusieurs différences marquées, surtout dans la région N-terminale, ne pouvaient être dues qu'à une simple disparité entre espèces. Ces études suggéraient donc l'existence de plusieurs isoformes des TRs. Des travaux subséquents ont effectivement confirmé la présence de plusieurs isoformes chez l'humain, encodés par les gènes *c-erbA α* et *c-erbA β* , localisés sur les chromosomes 17 et 3 respectivement (Lazar, 1993).

L'épissage alternatif du gène *c-erbA α* produit les isoformes TR α 1 et *c-erbA α 2*. Cette dernière possède dans sa région carboxy-terminale 122 acides aminés qui diffèrent de TR α 1 et qui sont critiques pour la liaison des HTs. De plus, *c-erbA α 2* reconnaît, quoique faiblement, les éléments de réponse aux hormones thyroïdiennes, mais est incapable de moduler la transcription. *C-erbA α 2* peut donc agir comme un inhibiteur de l'action des HTs en compétitionnant pour les sites de reconnaissance des récepteurs sur l'ADN (Lazar, 1993). Les isoformes TR β pour leur part sont issues de l'usage alternatif de différents promoteurs du gène *c-erbA β* qui amènent la production des récepteurs actifs TR β 1, 2 et 3 (Lazar, 1993); (Williams, 2000). La séquence de ces trois isoformes est identique sauf pour leur région amino-terminale qui ne comporte aucune homologie. D'autre part, à l'exception de TR β 2 qui est exprimée d'une façon presque exclusive au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire et certaines régions

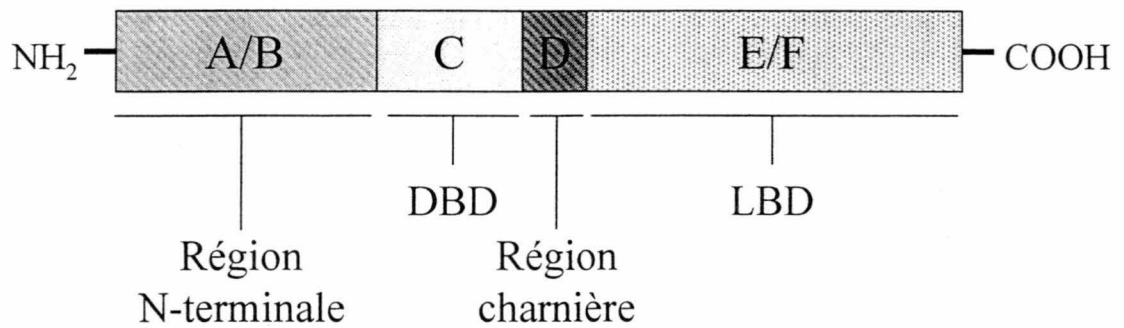
du SNC, l'expression des isoformes TR α 1, β 1 et β 3 est quant à elle ubiquiste (figure 4b).

2.2.4 DOMAINES FONCTIONNELS DES TRs

Les isoformes des TRs, comme tous les récepteurs nucléaires, ont une structure générale commune : une région amino-terminale variable (A/B), un domaine central de liaison à l'ADN (C), une région charnière comportant un signal de localisation nucléaire (D) et une région carboxy-terminale pouvant lier le ligand (E/F) (figure 4a). En fait, ces domaines et régions sont pour la plupart multifonctionnels et le nom qui leur est attribué ne correspond qu'à une fraction de leur rôle.

D'abord, la séquence de la région amino-terminale, dont on connaît moins les fonctions, est la plus divergente entre toutes les isoformes des TRs. En fait, entre TR β 1, 2 et 3, seule cette région diffère, ce qui suggère que cette portion pourrait déterminer la spécificité de la réponse transcriptionnelle par une isoforme. Par exemple, TR β 2 régule plus efficacement les gènes de l'axe hypothalamo-hypophysaire que les autres isoformes (Langlois et al., 1997) et des études récentes où ce gène est invalidé chez la souris suggèrent que cette isoforme est grandement impliquée dans le mécanisme de rétrocontrôle (Abel et al., 2001). Il a par ailleurs été montré que le corépresseur SMRT liait TR β 2 à deux endroits, entre autres par sa région amino-terminale, empêchant ainsi la formation d'un complexe corépresseur efficace (Yang et al., 1999). D'autres études ont également montré l'importance de

a)



b)

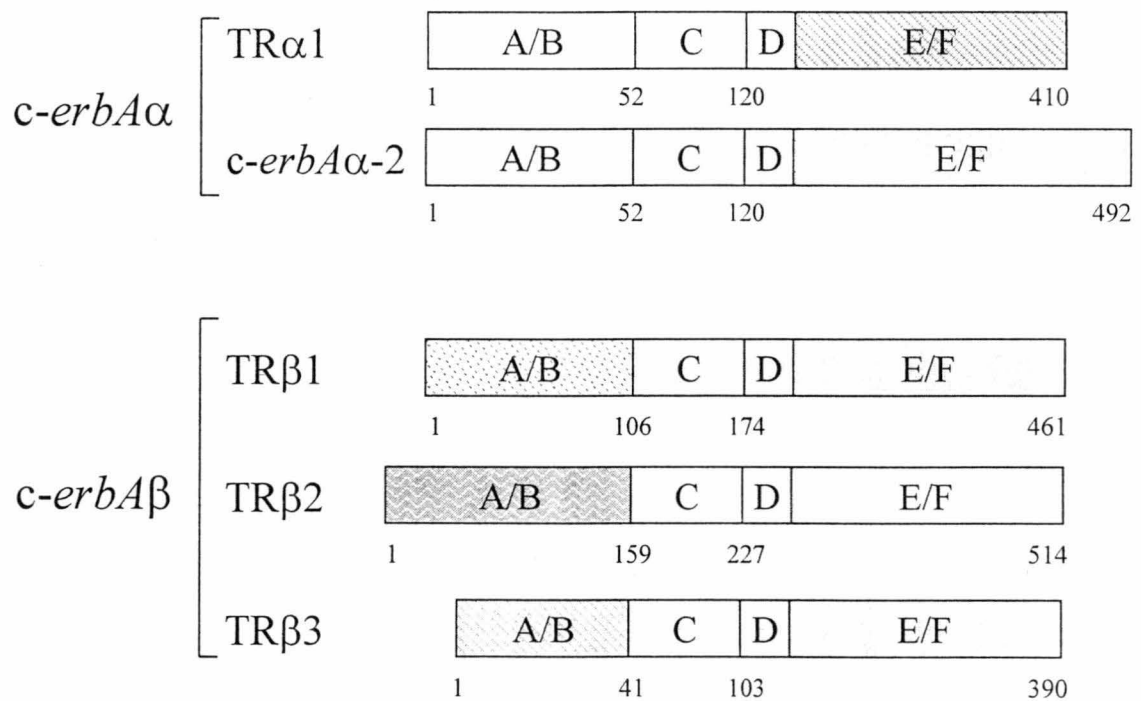


Figure 4. Les récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes (TR). a)

La structure générale d'un récepteur nucléaire est divisée en 4 régions dont un domaine central de liaison à l'ADN (DBD) ainsi qu'un domaine de liaison au ligand (LBD). b) Il existe 5 isoformes de TR issues des 2 gènes *c-erbAα* et *β*.

cette région dans l'activation transcriptionnelle par sa liaison avec le facteur de transcription TFIIB, qui se lie au domaine d'activation AF-1 du récepteur (Baniahmad et al., 1993). Cependant, cette portion n'est pas nécessaire à l'activité transcriptionnelle de TR β 1 chez le rat (Thompson and Evans, 1989), suggérant le rôle modulateur plutôt qu'essentiel de cette région. Finalement, ce domaine influence la conformation des récepteurs, afin de permettre une liaison efficace aux TREs ainsi qu'aux partenaires de dimérisation et aux corégulateurs.

Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) des TRs est constitué de deux doigts de zinc, chacun composé de quatre cystéines reliées par un ion zinc (figure 5). L'intégrité de chacune de ces structures est nécessaire à une liaison efficace sur les TREs. La boîte P, située dans le 1^{er} doigt de zinc, est responsable de la reconnaissance d'une séquence spécifique sur l'ADN (Nelson et al., 1995). Il a également été montré que quelques acides aminés du DBD, appelés boîte T, étaient impliqués dans la dimérisation du récepteur (Rastinejad et al., 1995). On retrouve aussi dans cette région un signal mineur de localisation nucléaire et récemment, un groupe de chercheur a également identifié dans le DBD un signal d'exportation nucléaire pour une dizaine de RNs (Black et al., 2001). Depuis peu, le DBD des TRs, ainsi que d'autres RNs, est également une cible pour la liaison de différentes protéines. PCAF a été le premier coactivateur décrit pour sa liaison à cette région des RNs (Blanco et al., 1998), mais plusieurs exemples se sont ajoutés depuis, comme le coactivateur tissu-spécifique GT198 (Ko et al., 2002) ainsi que la « human immunodeficiency virus type 1 Tat binding protein-1 », repêchée lors d'un criblage utilisant le DBD de TR β 1 (Ishizuka et

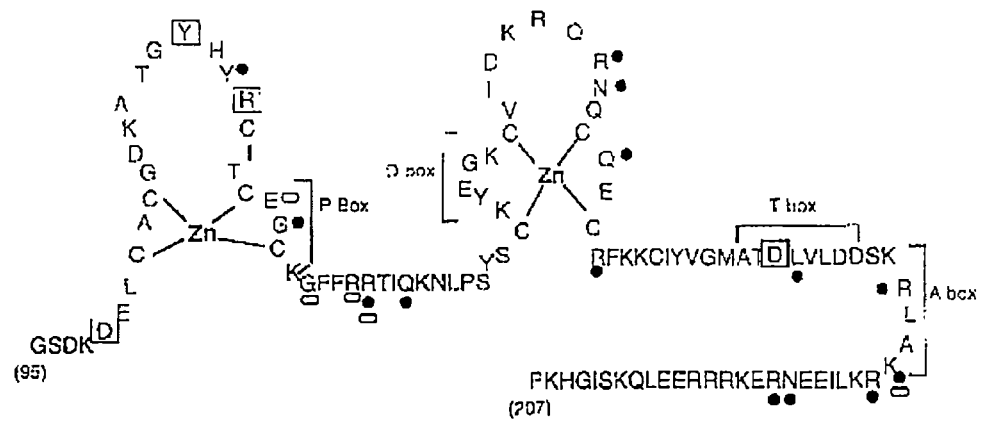


Figure 5. Structure du domaine de liaison à l'ADN de TRβ1.
 Représentation schématique des deux doigts de zinc et des différentes régions du DBD. Tiré de Rastinejad et al., 1995.

al., 2001). La protéine PSF, impliquée initialement dans l'épissage alternatif de l'ARNm, est également reconnue pour lier le DBD des TRs et potentialiser l'activité répressive du récepteur (Mathur et al., 2001). D'autres exemples similaires ont été décrits pour différents RNs, ce qui suggère fortement que cette portion du récepteur soit un important site de régulation pour cette famille de récepteurs.

La région charnière localisée entre le DBD et le domaine de liaison du ligand (LBD) est constituée d'une séquence riche en lysine qui serait associée au signal principal de localisation nucléaire (Evans, 1988). Suite à leur synthèse, les TRs doivent passer du cytoplasme au noyau par un mécanisme encore aujourd'hui mal connu. Selon la littérature, la majorité des TRs se retrouve au noyau, liés de façon constitutive à l'ADN. Le mécanisme de transport des récepteurs nucléaires est un aspect très peu étudié à ce jour. Une étude récente a toutefois montré à l'aide de protéines fluorescentes l'importance de la région charnière dans la translocation des TRs (Zhu et al., 1998). Cependant, alors que ce groupe montrait qu'en absence de T₃, les TRs étaient présents au niveau nucléaire dans un rapport de 1,5 (noyau/cytoplasme) et que ce rapport grimpait à 5,5 en présence de l'hormone, une autre équipe a observé un transport très rapide des récepteurs et une présence nucléaire presque exclusive dans leur modèle, en absence ou en présence de l'hormone (Baumann et al., 2001). D'autre part, différentes fonctions sont également associées à cette portion du récepteur. La boîte LXXLL constitue par exemple un site de reconnaissance important pour certains corépresseurs, tels SMRT (Chen and Evans, 1995) et N-CoR (Horlein et al., 1995). Un article récent a aussi décrit l'importance de

la région charnière à la fois pour la reconnaissance des TREs, la liaison du ligand et la dimérisation du récepteur (Miyamoto et al., 2001).

Finalement, le domaine de liaison du ligand (LBD) est sûrement celui qui a été le plus étudié à ce jour. Comme son nom l'indique, cette région carboxy-terminale comporte une poche hydrophobique accueillant la T_3 avec une forte affinité. L'hélice douze (H12) du récepteur répond de façon particulière à cette association. Déployée en absence d'hormone, l'hélice se referme sur la poche hydrophobique lorsque le ligand pénètre à l'intérieur, entraînant un changement conformationnel du récepteur (figure 6) (Hu and Lazar, 2000). D'ailleurs, la région LBD comporte plusieurs sites de liaison par des corégulateurs, qui reconnaissent de façon préférentielle le récepteur dans son état lié ou non, selon la conformation apportée par l'hélice douze (Hu and Lazar, 2000). Par exemple, les corépresseurs N-CoR et SMRT se lient à la boîte CoR située dans l'hélice 1 du LBD, en absence du ligand (Horlein et al., 1995); le repliement de l'H12 entraîne la libération de ces protéines en présence de l'hormone. Il a été montré que la délétion de cette hélice amène une liaison constitutive des corépresseurs et un état répressif constitutif des récepteurs (Hu and Lazar, 2000). Cette portion du récepteur est également essentielle à la formation de dimères. Une surface hydrophobique composée de 9 heptades sert d'interface potentielle à la dimérisation. Effectivement, des mutations de la 9^e heptade entraînent une diminution de la formation d'homo- et d'hétérodimères (Forman and Samuels, 1990). D'autre part, il a également été montré qu'une séquence particulière localisée dans l'hélice douze des TRs était nécessaire à l'activité transcriptionnelle des récepteurs. Des

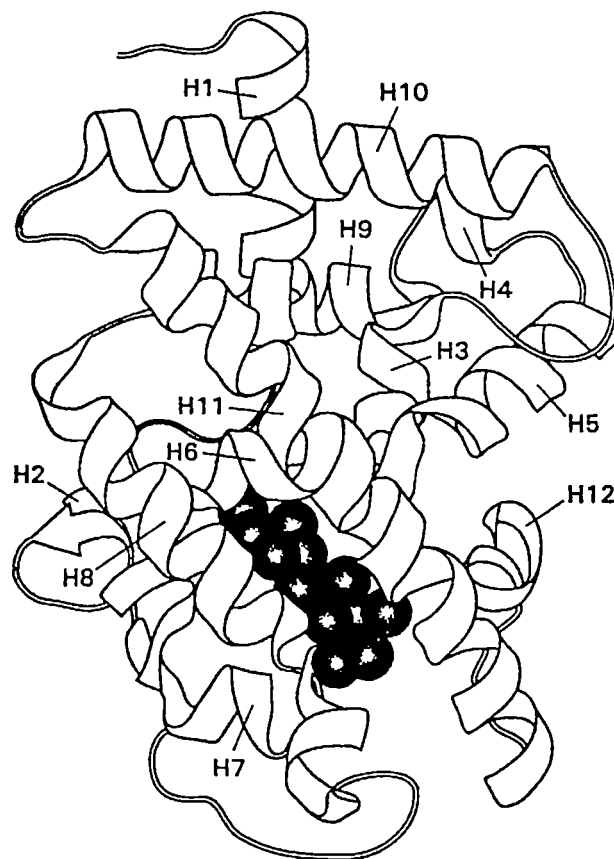


Figure 6. Structure du domaine de liaison du ligand de TR α 1. Représentation schématique des α -hélices, le ligand est représenté par la masse noire. Tiré de Wagner et al., 1995.

mutations de ce domaine d'activation, appelé AF-2, montrent que le récepteur lie normalement l'ADN et la T₃, mais est incapable d'activer la transcription (Tone et al., 1994). L'interaction du domaine AF-2 avec des protéines coactivatrices, tel SRC-1, pourrait expliquer ces observations (Ribeiro et al., 1998).

2.2.5 MÉCANISMES DE RÉGULATION POSITIVE

Selon leur environnement protéique et les séquences d'ADN reconnues, les TRs peuvent entraîner une régulation positive ou négative. Dans le premier cas, l'absence de T₃ entraîne la répression transcriptionnelle des gènes régulés par les TRs, et la présence de l'hormone active la transcription. L'effet inverse est observé pour les gènes régulés négativement. Les mécanismes de régulation positive par les TRs impliquent plusieurs aspects qui n'ont pas tous été élucidés. Dans des essais de rétention sur gel (EMSA), il a été montré *in vitro* que les TRs peuvent lier des TREs naturels et artificiels sous forme de monomères, d'homodimères ou d'hétérodimères (Lazar et al., 1991). L'isoforme TRβ1 a tendance à former davantage d'homodimères que TRα1, suggérant que le potentiel de dimérisation serait différent pour chacune des isoformes. Le récepteur nucléaire de l'acide 9-cis rétinoïque, le RXR, est un partenaire d'hétérodimérisation pour plusieurs récepteurs nucléaires, dont les TRs. RXR semble faciliter la liaison du récepteur sur certains TREs, et potentialise également leur activité transcriptionnelle (Lee et al., 1994). Un autre effet important de la dimérisation est d'accroître le répertoire de gènes ciblés par les HTs : les changements de conformation tertiaires amenés par la liaison d'un partenaire

protéique favorise la reconnaissance de différents arrangements de TREs (Glass, 1996). De plus, il existe 3 isoformes actives de RXR, ce qui pourrait amener la liaison préférentielle de certains sites de reconnaissance, selon la séquence ou l'orientation des demi-sites consensus. Finalement, on observe également sur EMSA la formation d'hétérodimères entre les TRs et d'autres récepteurs nucléaires tels RAR, PPAR et VDR (Yen, 2001). Le rôle physiologique de ces complexes demeure inconnu, mais on peut suggérer des réactions croisées qui augmenteraient la complexité de régulation de certains gènes.

2.2.6 IMPORTANCE DES CORÉGULATEURS

En plus de partenaires de dimérisation, les RNs recrutent des protéines corégulatrices qui sont essentielles à leur activité transcriptionnelle. La fonction connue des corégulateurs est double : interagir avec les protéines de la machinerie transcriptionnelle et engendrer un remodelage de la chromatine. Comme décrit précédemment, les récepteurs des hormones thyroïdiennes répriment la transcription de gènes cibles en absence de T_3 , contrairement aux récepteurs stéroïdiens. Cette action nécessite la liaison de corépresseurs. Une interaction directe entre les TRs et TFIIB, une composante clé de la machinerie transcriptionnelle, a d'abord été observée (Baniahmad et al., 1993). Le rôle suggéré de cette liaison serait d'interférer avec l'assemblage d'un complexe initiateur de la transcription au niveau du promoteur. Cette action n'est cependant pas suffisante, car la protéine TFIIB est également reconnue par les TRs liés à la T_3 . Cette interaction aurait ainsi une fonction répressive

et activatrice, selon l'environnement protéique et l'état du récepteur. Par la suite, deux corépresseurs ont simultanément été identifiés en 1995 : N-CoR (*nuclear receptor co-repressor*) (Horlein et al., 1995) et SMRT (*silencing mediator for RAR and TR*) (Chen and Evans, 1995). Ces deux protéines possèdent une taille similaire ainsi que des domaines fonctionnels semblables (figure 7a). N-CoR et SMRT interagissent ensuite avec d'autres partenaires, tels Sin3 ainsi que des protéines possédant une activité histone déacétylase (HDAC) (Nagy et al., 1997). La déacétylation des histones augmente l'affinité de l'ADN pour ces protéines et favorise un assemblage compact des nucléosomes, rendant la structure moins accessible aux protéines de la machinerie transcriptionnelle. Par le fait même, l'utilisation de trichostatine A, un inhibiteur d'HDAC, diminue fortement la répression effectuée par les récepteurs non liés (Wong et al., 1998). Des protéines impliquées dans la méthylation, « methyl-CpG-binding proteins », ont également été associées au complexe répresseur Sin3-HDACs (Nan et al., 1998), ce qui suggère des mécanismes de régulation supplémentaires dans l'action répressive des récepteurs nucléaires.

Lorsque la T₃ lie son récepteur, l'hélice 12 du LBD se referme sur la poche hydrophobe contenant le ligand et le changement conformationnel engendré libère les corépresseurs (Hu and Lazar, 2000). Il y a alors recrutement de protéines coactivatrices qui ont des actions opposées à celles décrites pour les corépresseurs. Le criblage double-hybride dans la levure a été une méthode privilégiée pour identifier de nouveaux partenaires d'interaction aux récepteurs liés. Plusieurs membres de la famille de coactivateurs SRC (*steroid receptor coactivator*) ont été identifiés de cette

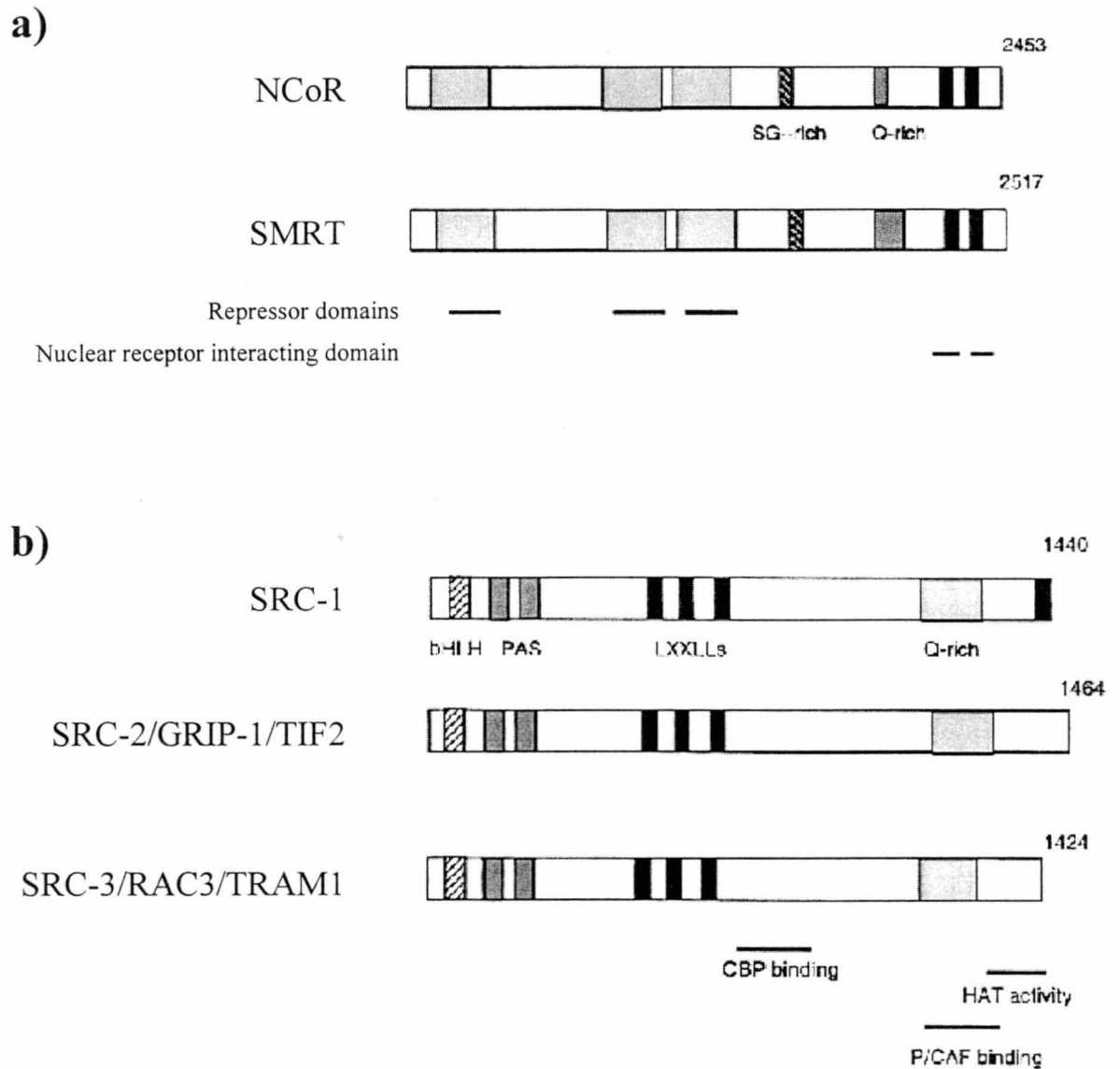


Figure 7. Principaux corégulateurs connus. *a)* NCoR et SMRT sont des corépresseurs pour les TRs. *b)* La famille des SRCs sont des coactivateurs pour plusieurs récepteurs nucléaires. Tiré de Yen PM, 2001.

façon (figure 7b) (Leo and Chen, 2000). Ces protéines interagissent avec le domaine d'activation AF-2 des récepteurs nucléaires *via* un motif LXXLL. Par ailleurs, ces coactivateurs possèdent une activité histone acétyltransférase (HAT) intrinsèque qui, à l'opposé de l'activité HDAC, diminue l'affinité de l'ADN pour les histones et favorise une structure relâchée de la chromatine. Celle-ci devient alors plus accessible aux diverses protéines impliquées dans la transcription. Par la suite, des études ont montré l'interaction entre SRC-1 et le coactivateur CBP/p300, une protéine interagissant avec des facteurs de transcription, tels CREB et AP-1 (Chakravarti et al., 1996). Un autre coactivateur, PCAF, interagit à la fois avec les TRs, CBP/p300 et des protéines de la machinerie transcriptionnelle en plus de posséder une activité HAT intrinsèque. Toutes ces protéines forment un énorme complexe (figure 8) qui favorise l'activation de la transcription par les TRs. D'autres partenaires d'interaction s'ajoutent à la liste déjà longue, mais des travaux supplémentaires seront nécessaires pour déterminer le rôle de chacun dans la réponse transcriptionnelle. La redondance des coactivateurs pourrait s'expliquer par une expression tissulaire différentielle et d'autre part, l'environnement protéique général d'un facteur de transcription pourrait favoriser le recrutement de l'une ou l'autre de ces protéines. Finalement, deux voies principales tendent à expliquer les mécanismes d'action des corégulateurs. D'abord, la formation de contacts directs avec des protéines de la machinerie transcriptionnelle et ensuite, la modification de l'environnement général du récepteur, entre autres par un remodelage de la chromatine issu de phénomènes ATPase-dépendants, d'acétylation ou de méthylation (Jenster, 1998).

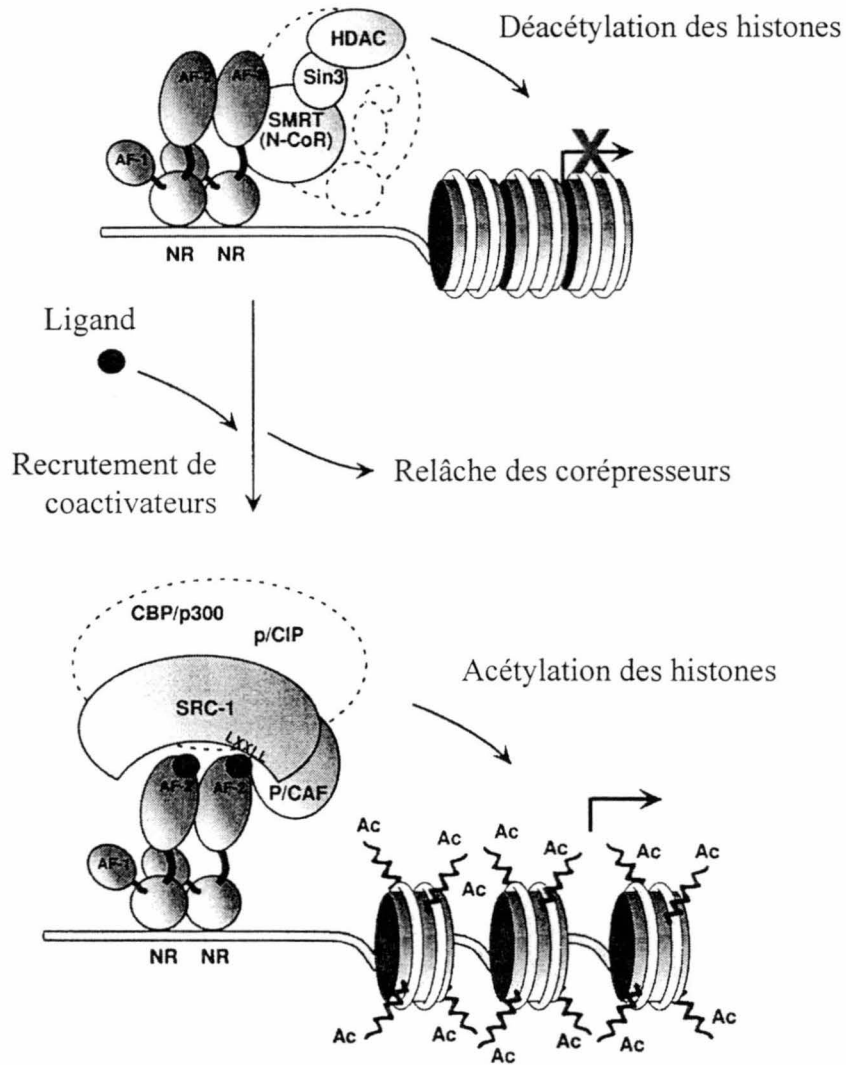


Figure 8. Mécanisme de régulation positive. En absence du ligand, les récepteurs recrutent des corépresseurs, qui sont relâchés en sa présence. Les coactivateurs viennent alors s'y lier. Une fonction importante des corégulateurs est d'effectuer le remodelage de la chromatine, entre autres par un mécanisme d'acétylation. Tiré et traduit de Robyr et al., 2000.

2.2.7 MÉCANISMES DE RÉGULATION NÉGATIVE

La régulation négative par les récepteurs des hormones thyroïdiennes a d'abord été observée pour les gènes de l'axe hypothalamo-hypophysaire, soit ceux codant pour la TRH et les sous-unités de la TSH (Hollenberg et al., 1995; Burnside et al., 1989; Bodenner et al., 1991). Cependant, on sait aujourd'hui que d'autres gènes sont régulés négativement par les HTs, tels ceux codant pour les pro-convertases 1 et 2 (Li et al., 2001; Li et al., 2000) ainsi que plusieurs gènes hépatiques (Feng et al., 2000). La réponse observée dans des essais transcriptionnels utilisant le promoteur de ces gènes est à l'opposé de ce qui se déroule en régulation positive : on observe effectivement une activation transcriptionnelle par les TRs en absence de T_3 et une répression en sa présence. Ce mécanisme d'action est beaucoup moins étudié et ne correspond pas nécessairement à l'inverse des phénomènes décrits précédemment. D'abord, on ne retrouve pas les mêmes arrangements nucléotidiques dans les éléments de réponse négatifs (nTRE) que dans les éléments de réponse positifs (pTRE) (Tableau 1). Un site consensus monomérique a par exemple été identifié dans le promoteur du gène codant pour la TRH (Hollenberg et al., 1995), ce qui laisse suggérer que la liaison du TR sur les nTREs se fait différemment que sur un élément de réponse classique.

D'autre part, étant donné l'arrangement particulier des nTREs, le rôle du RXR a été réévalué. Des travaux effectués dans notre laboratoire ont montré que le RXR favorisait grandement l'action des isoformes $TR\alpha 1$ et $TR\beta 1$ sur les nTREs étudiés.

L'utilisation de différentes constructions a également permis de constater que le domaine de liaison à l'ADN de RXR n'était pas nécessaire à cette action. Ces résultats suggèrent donc que TR et RXR ne forment pas d'hétérodimères classiques sur ces nTREs et que l'action de RXR est similaire à celle d'un corégulateur (Laflamme, soumis 2001). D'autre part, il a auparavant été montré que l'isoforme TR β 2, exprimée presque exclusivement au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire, était plus efficace pour réguler négativement ces gènes, en absence de RXR, et que les acides aminés 89 à 116 étaient responsables de cette spécificité (Langlois et al., 1997). D'ailleurs, l'étude de souris invalidées pour le gène TR β 2 souligne l'implication majeure de cette isoforme dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Abel et al., 2001). L'implication des corégulateurs dans la régulation négative a été peu étudiée, et toutes ces observations dénotent bien que de nombreuses informations sont manquantes dans ce domaine et que plusieurs aspects restent à évaluer. Par exemple, un groupe de chercheurs a récemment voulu étudier le remodelage de la chromatine au niveau des gènes régulés négativement dans un modèle utilisant les œufs de *Xenopus* (Collingwood et al., 2001). De façon surprenante, alors qu'il a été bien démontré que les gènes de la TRH et de glycoprotéine- α sont régulés négativement dans des cellules de mammifères, ces gènes répondent de façon positive dans les essais utilisant les œufs de *Xenopus*. Ces résultats suggèrent donc que l'environnement protéique est essentiel à la réponse adéquate d'un récepteur et qu'il est assez difficile de rassembler tous ces facteurs dans un seul modèle cellulaire.

3. INITIATION DU PROJET DE MAÎTRISE

Afin d'acquérir une meilleure compréhension du mécanisme d'action des hormones thyroïdiennes, nous avons formulé l'hypothèse initiale que de nouveaux partenaires protéiques pouvaient interagir avec les TRs, ce qui expliquerait certaines observations non résolues. Pour identifier ces nouvelles protéines, nous avons criblé une librairie d'ADNc de cerveau fœtal humain à l'aide d'une méthode de double-hybride dans la levure. Nous avons utilisé une banque d'ADNc de cerveau fœtal humain, car les HTs possèdent des actions certaines à ce niveau. Nous avons construit un appât contenant les acides aminés 89 à 220 de l'isoforme TR β 2. Cette séquence correspond à la portion amino-terminale responsable de la spécificité du récepteur dans la régulation négative ainsi que le domaine de liaison à l'ADN entier. De cette manière, nous avons identifié cinq nouveaux partenaires protéiques : Enigma, RanBPM, FHL2, GRP1 et une protéine non répertoriée. La caractérisation initiale de l'interaction entre GRP1 et les TRs a été le sujet de mon projet de maîtrise.

4. ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR GRP1

4.1 ARFs

La protéine GRP1 (*general receptor for phosphoinositides-1*), récemment identifiée (Franco et al., 1998), a comme seul rôle connu à ce jour d'être un facteur d'échange nucléotidique pour ARF (*ADP- γ bosylation factor*). Les protéines ARFs

sont de petites protéines G monomériques, d'environ 20kDa appartenant à la famille Ras (Jackson and Casanova, 2000). Leur état alterne entre la forme inactive, liée au GDP, et la forme active liée au GTP. Elles ont donc besoin, contrairement aux protéines G hétérotrimériques, de protéines accessoires afin de déloger le GDP ou d'hydrolyser le GTP. Deux principales familles de protéines sont responsables de ces activités sur ARF, les cytohésines et les centaurines respectivement (Jackson et al., 2000). Chez les mammifères, il existe six protéines ARFs divisées en trois groupes selon l'analyse phylogénique, la séquence primaire, la taille et la structure. Les protéines de classe I (ARF 1 à 3), les plus connues, sont principalement impliquées dans la voie de sécrétion. Elles régulent entre autres l'assemblage de différents types de protéines du manteau des vésicules, telle la protéine COPI au niveau de l'appareil de Golgi, ainsi que les clathrines AP1 et AP3 (Roth, 1999) au niveau du réseau *trans*-golgien et des endosomes. La classe II comporte les protéines ARF4 et ARF5 qui ont encore à ce jour des fonctions inconnues. Finalement ARF6, le seul membre de la classe III, est pour sa part impliqué au niveau de l'endocytose, du recyclage membranaire ainsi que certains aspects de l'assemblage du cytosquelette d'actine (Chavrier and Goud, 1999).

4.2 FACTEURS D'ÉCHANGE NUCLÉOTIDIQUE (GEFs)

Le rôle principal du facteur d'échange nucléotidique est de catalyser la libération du GDP lié à ARF pour permettre la liaison d'un GTP. La conséquence de cette action est très importante, car elle régule directement l'activité de ARF. On croyait d'abord

que les protéines ARFs étaient ancrées constitutivement aux membranes *via* le myristate localisé dans leur portion amino-terminale (Jackson and Casanova, 2000). En fait, on croit actuellement que ARF-GDP n'est lié que faiblement aux membranes, que la libération du GDP suivie de la liaison du GTP stabiliserait le complexe en effectuant un changement conformationnel qui exposerait des groupements hydrophobes. Ce fut en 1996 que le premier GEF pour ARF a été identifié (Peyroche et al., 1996) et aujourd'hui, il existe toute une famille de facteurs d'échange pour ARF. Bien que très diversifiées, ces protéines possèdent toutes un domaine Sec7 qui est responsable de l'échange nucléotidique. Cette famille est divisée en deux groupes selon les similarités de séquence et les différences fonctionnelles : les GEFs de haut poids moléculaire et les GEFs de faible poids moléculaire, soit la famille des cytohésines dont fait partie GRP1.

La famille des cytohésines est constituée de trois membres : ARNO, cytohésine-1 et GRP1. Ces trois protéines sont homologues à plus de 80% et possèdent des domaines structuraux communs (Figure 9). D'abord un domaine hélicoïdal localisé dans la région amino-terminale. Chez ARNO, cette portion protéique serait impliquée dans l'homodimérisation de la molécule (Chardin et al., 1996). Cependant, il n'existe aucun indice de dimérisation pour GRP1 ou cytohésine-1. Une autre étude associe la fonction de cette région hélicoïdale à un signal de localisation au Golgi (Lee and Pohajdak, 2000). L'utilisation de la protéine fluorescente GFP couplée à différentes constructions des trois membres de la famille des cytohésines montrent une localisation cytosolique des protéines, avec un fort marquage au Golgi qui est éliminé

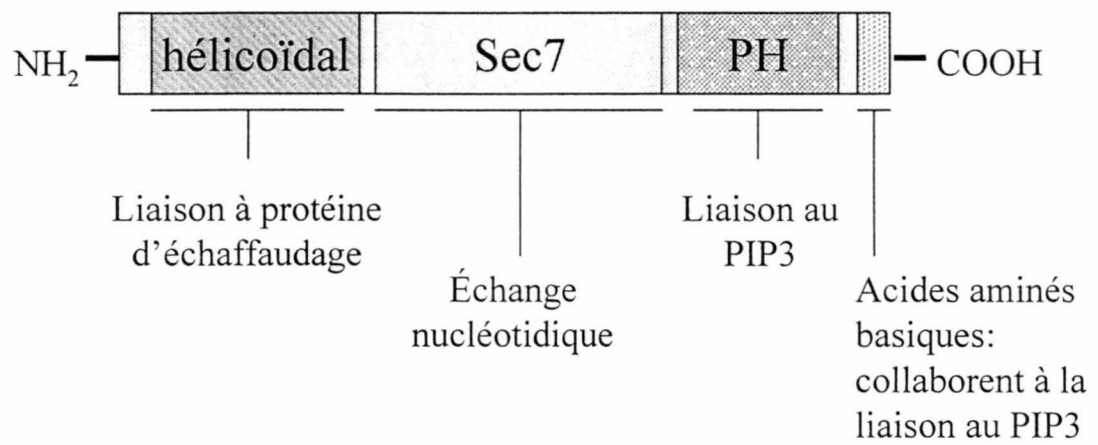


Figure 9. Domaines structuraux de la famille des cytohésines. Représentation schématique des domaines structuraux de GRP1, ARNO et cytohésine-1 ainsi que les rôles connus associés à chacun.

suite à la délétion du domaine hélicoïdal. Cependant, il a été montré plusieurs fois que GRP1 avait une localisation principalement cytoplasmique et qu'elle subissait une translocation à la membrane plasmique suite à une stimulation de la voie de la PI3K par des facteurs de croissance ou l'insuline (Venkateswarlu et al., 1998; Clodi et al., 1998; Oatey et al., 1999). Il sera donc intéressant d'étudier le rôle du domaine hélicoïdal dans cette optique.

La portion centrale de GRP1, ARNO et cytohesine-1 est composée du domaine Sec7 qui est responsable de l'échange nucléotidique sur ARF. Une certaine controverse existe sur le réel substrat de GRP1. Dans le premier article énonçant sa découverte (Franco et al., 1998), on observait un désassemblage de l'appareil de Golgi ainsi que la dispersion de ses protéines résidentes suite à la surexpression de GRP1. Ces observations laissent suggérer que les protéines ARFs de classe I étaient les substrats potentiels de GRP1, étant donné leurs fonctions dans la voie sécrétrice. Effectivement, plusieurs essais *in vitro* ont montré que la protéine avait le potentiel d'activer ARF1, plus faiblement ARF5 et pas du tout ARF6 (Franco et al., 1998; Klarlund et al., 1998). Cependant, certaines observations *in vivo* laissent entrevoir une certaine relation entre GRP1 et ARF6 : la colocalisation des deux protéines à la membrane plasmique suite à une stimulation de la voie PI3K (Langille et al., 1999) et les effets cellulaires sur le cytosquelette suite à l'inhibition de GRP1 (Clodi et al., 1998) en sont des exemples. Finalement, après modifications des conditions d'essai, une activité d'échange a pu être observée sur ARF6 *in vitro* (Langille et al., 1999). À

ce jour, les experts privilégient donc l'interaction GRP1-ARF6 bien que l'implication de GRP1 dans l'action de ARF1 et ARF5 est également possible.

La portion carboxy-terminale de GRP1 possède un domaine PH (*pleckstrin homology domain*) ainsi qu'une séquence d'acides aminés polybasiques. Cette région de GRP1 reconnaît les phosphoinositides membranaires et possède une plus forte affinité pour le PIP3 que le PIP2 (Klarlund et al., 2000; Venkateswarlu et al., 1998). En fait, GRP1 a d'abord été identifiée suite à la recherche de protéines capables de lier les phosphoinositides : ces molécules sont reconnues pour être des substrats importants pour la production de seconds messagers. On connaît aujourd'hui plusieurs hormones et facteurs de croissance qui activent l'enzyme PI3K, qui une fois activée phosphoryle le cycle inositol des phosphoinositols membranaires. Il existe plusieurs types de PI3K qui phosphorylent préférentiellement le PI, PIP ou PIP2 (Fukui et al., 1998). Cependant, la PI3K semble préférer le PIP2 comme substrat, le PIP3 devenant ainsi un second messenger. Il a par ailleurs été montré que la translocation de GRP1 à la membrane plasmique découle directement de la liaison de son domaine PH et sa région polybasique au PIP3. En fait, de l'activation de la PI3K découle la formation du PIP3, sa reconnaissance par la région C-terminale de GRP1 et finalement, la relocalisation de GRP1 à la membrane (figure 10). La délétion de cette région inhibe ainsi cette translocation et l'utilisation de cette portion seule couplée à la GFP est capable de transloquer à la membrane plasmique (Venkateswarlu et al., 1998). Il n'y a aucune étude sur le rôle des acides aminés polybasiques situés à la toute fin de GRP1. Cependant, des travaux récents réalisés *in vitro* sur la cytohésine-1 ont montré qu'ils

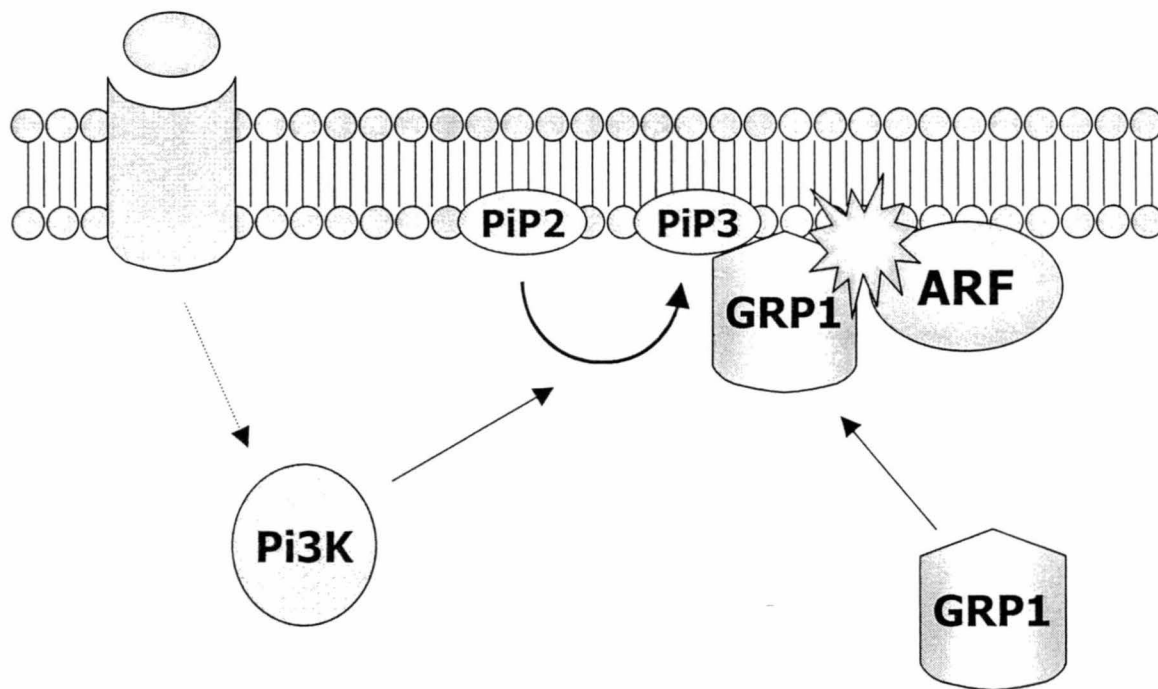


Figure 10. Modèle de translocation de GRP1 à la membrane plasmique.
 L'activation de l'enzyme PI3K entraîne la formation de PIP3 à partir du PIP2 membranaire. Le domaine PH de GRP1 reconnaissant avec une grande affinité le PIP3, la protéine sera dirigée du cytoplasme à la membrane où son action sur les protéines ARFs s'initiera.

étaient essentiels à la reconnaissance du PIP3 par le domaine PH (Dierks et al., 2001). On peut donc supposer un rôle similaire pour cette région de GRP1, l'homologie étant très grande entre ces deux portions protéiques.

4.3 GRP1, AVENUES POSSIBLES

GRP1 se situe donc en ligne directe avec la voie de la PI3K. Il a d'ailleurs été montré que l'utilisation d'un inhibiteur de cette enzyme, la wortmanine, inhibe la translocation à la membrane plasmique de GRP1 observée suite à une stimulation de cette voie (Venkateswarlu et al., 1998). Sachant que l'activation de cette enzyme stimule plusieurs effecteurs, quelques groupes tentent maintenant d'élucider la fonction physiologique exacte de GRP1 *via* ARF dans ces divers systèmes. Par exemple, on connaît plusieurs effets cellulaires de l'insuline qui pourraient être associés à la stimulation de la PI3K, tels un réarrangement du cytosquelette d'actine, la translocation des transporteurs de glucose GLUT4 à la membrane plasmique, ainsi qu'une augmentation de la synthèse d'ADN. De tous ces aspects étudiés, seul le réarrangement du cytosquelette d'actine au niveau des ondulations membranaires, et non *via* les fibres de stress, impliquerait GRP1 (Clodi et al., 1998). Il n'est donc pas étonnant de constater que GRP1 colocalise avec ARF6 dans ces ondulations ou « ruffles » membranaires créés par le réarrangement du réseau cortical d'actine (Langille et al., 1999; Klarlund et al., 2001). Ceci pourrait suggérer un rôle particulier pour GRP1 dans l'endocytose, une fonction déjà attribuée à ARF6 et qui nécessite, entre autres, cette formation de « ruffles ».

Finalement, dans cette recherche de fonctions précises pour GRP1, quelques équipes ont identifié deux nouvelles protéines, GRASP (Nevrivy et al., 2000) et GRSP1 (Klarlund et al., 2001), qui auraient comme rôle d'être toutes les deux des protéines d'échaffaudage pour GRP1. La première, GRASP (*GRP1-associated scaffold protein*), est une protéine induite par l'acide rétinoïque. Elle serait fortement exprimée au niveau du cerveau et posséderait entre autres un domaine PDZ. GRASP interagirait avec le domaine hélicoïdal de GRP1 et serait impliquée, selon les auteurs, dans le ciblage et l'ancrage membranaire du facteur d'échange. Pour sa part, GRSP1 (*GRP1 signaling partner 1*) interagirait également avec le domaine hélicoïdal de GRP1 *via* ses propres domaines hélicoïdaux. Il existerait probablement des isoformes de GRSP1 issues d'épissage alternatif, étant donné qu'on retrouve des protéines de différents poids moléculaires selon les tissus étudiés. La colocalisation de GRP1 et de GRSP1 au niveau des ondulations membranaires de cellules stimulées à l'insuline a également été observée. Dans cet article, on suggère que GRP1 puisse faire partie d'un large complexe signalétique qui participerait à toute une série de fonctions biologiques. Il se pourrait donc que nous possédions une pièce importante du casse-tête qui nous permettra d'acquérir une meilleure compréhension à la fois des rôles physiologiques de GRP1, mais surtout des mécanismes d'action des hormones thyroïdiennes.

II. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action d'une protéine, il est pertinent d'aller étudier ses partenaires d'interactions. La découverte de GRP1 comme étant un nouveau partenaire pour les TRs initie un très vaste projet de recherche. Plusieurs hypothèses sont possibles quant au rôle de cette nouvelle interaction. D'abord, étant donné la localisation subcellulaire de GRP1, il est possible qu'elle soit impliquée dans une action non génomique des HTs. Effectivement, GRP1 pourrait empêcher la liaison des TRs à l'ADN et favoriser une action qui ne serait pas associée à une régulation transcriptionnelle. D'ailleurs, l'implication de GRP1 dans le réarrangement du cytosquelette d'actine par ARF6 a peut-être un lien avec les effets observés de réarrangement du cytosquelette d'actine de cellules neuronales par les HTs. D'autre part, il est également possible que GRP1 soit un nouveau corégulateur pour les TRs et influence leur activité transcriptionnelle. D'autres hypothèses peuvent être plausibles sur la fonction de cette nouvelle interaction et seront discutées dans la section « Discussion ».

L'objectif initial de mon projet de maîtrise a donc été de débiter la caractérisation de cette nouvelle interaction. Voici les objectifs spécifiques de mes travaux de recherche :

- Identifier de nouveaux partenaires d'interaction pour les récepteurs des hormones thyroïdiennes.

- Confirmer et cibler les régions d'interaction entre GRP1 et les TRs.
- Localiser l'expression de GRP1 dans différents tissus et lignées cellulaires.
- Vérifier l'effet de GRP1 sur l'activité transcriptionnelle par les TRs.

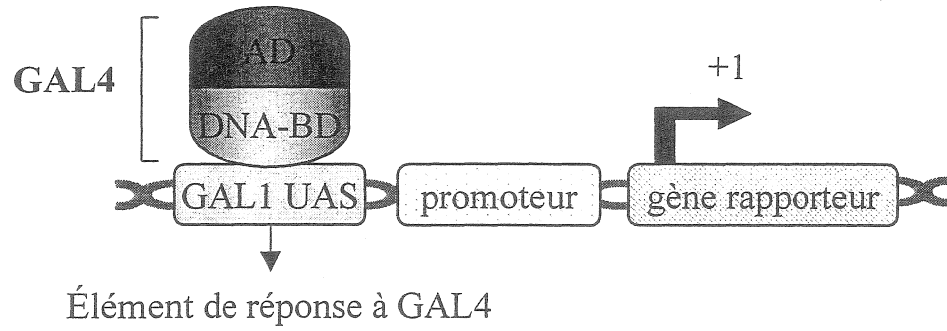
III. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 CRIBLAGE DOUBLE-HYBRIDE

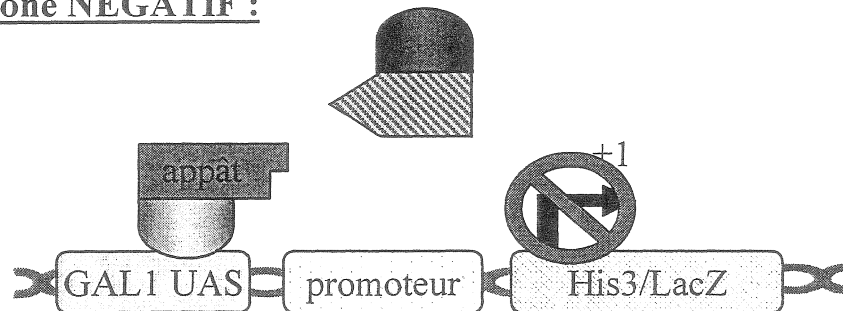
1.1 PRINCIPE DU CRIBLAGE DOUBLE-HYBRIDE

Afin d'identifier de nouveaux partenaires protéiques des récepteurs des hormones thyroïdiennes, nous avons utilisé le système « MATCHMAKER Two-Hybrid System 2 » (Clontech, Palo Alto, CA). Le principe de la technique réside dans le fait que les facteurs de transcription eucaryotes sont composés de domaines physiquement séparables et fonctionnellement indépendants. Le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4 (Gal4-DBD) chez la levure reconnaît un site d'activation en amont (UAS) des gènes régulés, tandis que son domaine d'activation (Gal4-AD) dirige la transcription du complexe de l'ARN polymérase II. Les deux régions sont essentielles à l'activation normale des gènes. À l'aide de techniques de biologie moléculaire, il est possible d'exprimer dans une même cellule ces deux portions de façon distinctive. L'interaction directe entre les deux régions devient alors impossible, cependant le rapprochement dans un même environnement est suffisant pour activer la transcription des gènes contenant un UAS dans leur région promotrice. En couplant une protéine appât au Gal4-DBD et une seconde protéine interagissant avec la 1^{ère} au Gal4-AD, seule leur liaison permettra d'activer la transcription de gènes rapporteurs (figure 11).

a)



b) Clone NÉGATIF :



Clone POSITIF :

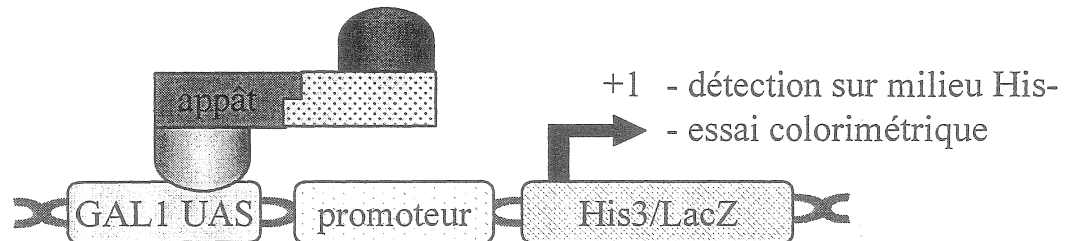


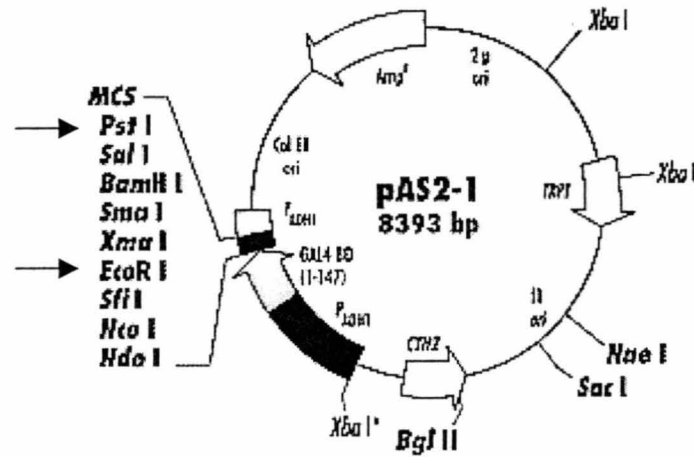
Figure 11. Criblage double-hybride. a) Composantes du système. b) Principe du criblage double-hybride.

1.2 CONSTRUCTION DES PLASMIDES

La protéine appât fut construite en utilisant la portion d'ADN codant pour les acides aminés 89 à 220 de l'isoforme TR β 2. Cette section a été isolée d'une construction de TR β 2 dans le vecteur d'expression eucaryote pSG5 (Stratagene, La Jolla, CA) à l'aide des enzymes de restriction *EcoRI* et *PstI*. Elle a été insérée dans le vecteur pAS2-1 (Clontech, Palo Alto, CA) à la suite de la séquence codant pour le Gal4-DBD et dans le même cadre de lecture. Cette région du récepteur correspond à la portion amino-terminale de TR β 2 responsable de sa spécificité dans la régulation négative ainsi que son domaine de liaison à l'ADN en entier. Le vecteur pAS2-1 possède un gène codant pour le marqueur nutritionnel tryptophane qui permettra de sélectionner le plasmide sur un milieu déficient en cet acide aminé (figure 12a). Il contient également une origine de réplication procaryote ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline permettant sa propagation bactérienne.

Les ADNc de la librairie de cerveau fœtal humain (Clontech, Palo Alto, CA) ont été introduits à la suite du Gal4-AD dans le vecteur pACT-2 (Clontech, Palo Alto, CA). La réaction de transcription inverse a été réalisée à l'aide d'une amorce *XhoI*-(dT)₁₅ et une séquence adaptatrice contenant une extrémité cohésive pour le site de restriction *EcoRI* a été ligué à l'extrémité 5' de l'ADNc nouvellement formé. Le nombre de clones indépendants de la librairie est estimé à 3,5 X 10⁶ par la compagnie. La librairie a été amplifiée et titrée selon le protocole de la compagnie par une autre

a)



b)

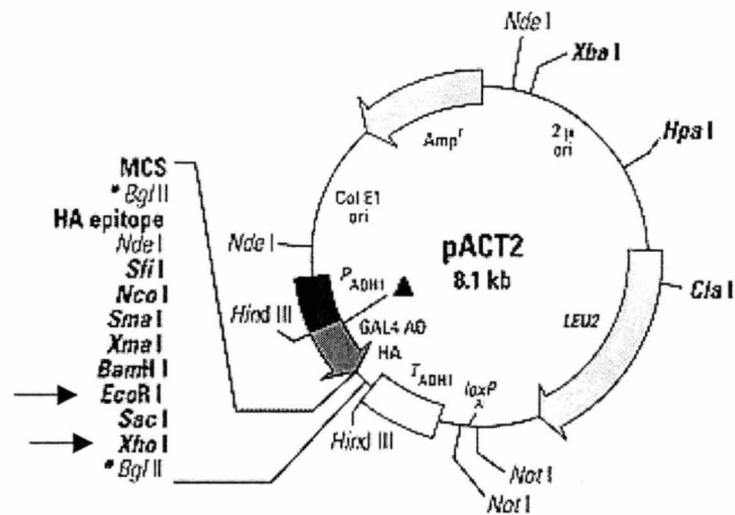


Figure 12. Vecteurs utilisés pour le criblage double-hybride. a) L'appât fut construit avec les acides aminés 89 à 200 de TR β 2 et inséré aux sites *EcoRI* et *PstI* du vecteur pAS21. b) La librairie fut introduite aux sites *EcoRI* et *XhoI* du vecteur pACT2.

étudiante avant mon arrivée dans le laboratoire. Ce vecteur comporte le gène codant pour le marqueur nutritionnel leucine (figure 12b) ainsi que les mêmes caractéristiques que pAS2-1 pour sa répllication et sa sélection bactérienne.

1.3 TRANSFORMATION DE LEVURES

La méthode à l'acétate de lithium est utilisée pour transformer les levures Y190. Cette souche de levure a été préférée à la souche CG1945 étant donné qu'elle favorisait, par un promoteur à l'histidine fuyant, les faux positifs plutôt que les faux négatifs. Il était ainsi préférable d'effectuer des tests supplémentaires pour confirmer la positivité d'un clone, plutôt que de possiblement passer à côté de protéines intéressantes. Cette technique a été utilisée à plusieurs reprises, à grande échelle pour cribler la librairie d'ADNc et également pour reconfirmer la positivité des clones.

Les levures sont striées par épuisement sur un pétri YPD-agar (2% peptone, 1% yeast extract, 1% agar) et incubées 3-4 jours à 30°C. 50 ml de milieu YPD est ensuiteensemencé avec quelques colonies et est incubé à 30°C toute une nuit avec agitation. La culture est transférée dans 300 ml de YPD et incubée à 30°C avec agitation pendant 3 heures jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm égale à 0,5. Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation à 1000g pendant 5 minutes et resuspendues dans 1,5 ml de tampon TE/LiAc (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 mM LiAc). 0,1 µg de chacun des plasmides d'intérêts est déposé dans des tubes 1,5 ml et 100 µl de cellules compétentes est ajouté. Après agitation, 600 µl de PEG/LiAc

(40% poly-éthylène glycol, 10 mM Tris-Hcl, 10 mM EDTA, 100 mM LiAc) est ajouté et la réaction est effectuée à 30°C pendant 30 minutes. 70 µl de DMSO sont ensuite ajoutés, les échantillons sont inversés et un choc thermique de 15 minutes à 42°C est réalisé. Après être laissées sur glace 1-2 minutes, les cellules sont centrifugées 5 sec à 14 000 RPM et resuspendues dans 500 µl de 1X TE avant d'être étendues sur un milieu sélectif SD (0.67% « Yeast nitrogen base without amino acids » (Clontech, Palo Alto, CA), 2% dextrose, 2% agar). Ce milieu minimal doit être complété avec tous les acides aminés et à cette étape, les acides aminés servant à la sélection sont omis du milieu. Une concentration de 25 mM de 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) (Sigma, Oakville, ON), un inhibiteur compétitif de la protéine HIS3, est également ajoutée au milieu pour diminuer la quantité de faux positifs.

1.4 ESSAI β -GALACTOSIDASE SUR FILTRE

Pour chaque pétri à tester, 1 filtre de type « VWR 410 » est trempé dans 2,5 à 5 ml de solution Z/X-Gal (16,1 g/L Na₂HPO₄·7H₂O, 5,5g/L NaH₂PO₄·7H₂O, 0,75 g/L, KCl, 0,246 g/L MgSO₄·7H₂O, 38 mM β -mercaptoethanol, 0,33 mg/ml X-Gal) dans un pétri vide. Un filtre sec est posé sur les colonies à tester et les levures sont délicatement adhérées en grattant le filtre. Celui-ci est trou   trois fois de façon asymétrique afin de pouvoir repérer facilement son orientation. Le filtre est submergé avec des pinces, colonies vers le haut, dans l'azote liquide pendant 10 sec pour lyser les cellules. Après son dégel, il est posé sur un filtre trempé, colonies vers le haut, en évitant les bulles d'air entre les deux. Le montage est incubé à la température de la

pièce et la vérification périodique de l'apparition de colonies bleues est effectuée. Les colonies possédant la protéine β -galactosidase sont identifiées en alignant le filtre et le pétri original.

2. ISOLATION DE GRP1 PAR RT-PCR

2.1 EXTRACTION D'ARN À L'AIDE DU RÉACTIF DE TRIzol

L'extraction d'ARN total est effectuée à l'aide du réactif de TRIzol (Invitrogen, Burlington, ON). Entre 3 et 5 X 10⁶ cellules sont lysées dans 1 ml de TRIzol, réactif qui protège l'ARN de la dégradation. 200 μ l de chloroforme sont ajoutés, la réaction est vigoureusement agitée et repose à la température pièce pendant 10 minutes. Les phases sont séparées par une centrifugation de 15 minutes à 12 000 rpm. L'ARN se retrouve dans la phase aqueuse qui est récupérée. 500 μ l d'isopropanol est ajouté pour précipiter l'ARN qui est récupéré après 10 min de centrifugation à 12 000 rpm. Le culot d'ARN est ensuite lavé avec 1ml de 75% EtOH et séché à l'air libre. L'ARN est resuspendu dans 15 μ l d'H₂O-DEPC et dissout pendant 5 min à 55°C avant d'être dosé au spectrophotomètre. Une unité de densité optique à 260 nm correspond à une concentration d'ARN de 40 μ g/ml.

2.2 RÉACTION DE TRANSCRIPTION INVERSE

La réaction de transcription inverse (RT) est réalisée en combinant 2 μ g d'ARN à 0,5 μ g d'amorce poly-d(T) (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC) dans un

volume de 9 µl complété avec de l'H₂O-DEPC. La réaction est chauffée 10 min à 72°C. 10 mM d'un mélange des 4 dNTPs, 200 unités de MMLV-RT (Promega, Nepean, ON), 4 µl de son tampon 5X, 10 mM de DTT et 1 µl de RNAGuard™ (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC) sont ajoutés dans un volume final de 20 µl complété avec de l'H₂O-DEPC. La réaction de transcription inverse se poursuit pendant 1 heure à 42°C. L'enzyme est ensuite dénaturée à 72°C pendant 10 min pour arrêter la réaction. Le produit obtenu est de l'ADN complémentaire.

2.3 AMPLIFICATION PAR PCR

L'amplification de GRP1 a été initialement produite suite à une RT sur l'ARN de cellules JEG-3 (ATCC). 4 µl de RT a été combiné à 0,5 µM d'amorces GRP1(A), 0,5 µM d'amorce GRP1(B) (Tableau 2), 200 µM d'un mélange des 4 dNTPs, 1,25 unités de Taq polymérase (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC) et 5 µl de son tampon 10X dans un volume final de 50 µl complété avec de l'H₂O. L'amplification de l'ADNc de l'enzyme « *hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase* » (HPRT), un gène exprimé de façon constitutive, a été utilisée comme contrôle positif interne; les amorces HPRT-UP et HPRT-LO (Tableau 2) ont servi à la réaction et un produit de 370 pb a été confirmé. Le protocole d'amplification est le suivant : 3 min à 94°C, (94°C, 30 sec; 55°C, 1 min; 72°C, 1 min) X 35 cycles, 5 min à 72°C. L'amplification a été réalisée sur un appareil Gene AMP PCR System (Perkin-Elmer). L'ADNc de GRP1 a été purifié sur un gel d'agarose 1% à l'aide de l'ensemble

Nom de l'amorce	Séquence
GRP1(A)	tctc <u>gtcgac</u> t <u>agatct</u> gaattcggggcgggagtggc SalI BglII
GRP1(B)	ctct <u>gtcgac</u> <u>agatct</u> ttgggtcttttacctgggtc SalI BglII
GRP1(pEGFP)	cctc <u>gtcgac</u> t <u>agatct</u> gaattcggggcgggagtggtc SalI BglII
GRP1(Sec7-PH)	caggtcgttcccgctgccatgcg <u>agatct</u> taaatggctcgt BglII
HPRT-UP	cctgctggattacattaaagcactg
HPRT-LO	cctgaagtactcattatagctaagg

Tableau 2. Séquences des amorces utilisées pour les différentes constructions.

« QIAEX II » (Qiagen, Mississauga, ON). Les différentes constructions utilisant cet ADN purifié seront décrites dans la prochaine section.

3. CONSTRUCTIONS

3.1 GRP1 COMPLET DANS PSG5 (AA 1-399)

L'ADNc de GRP1 complet a été isolé tel que décrit à la section précédente. Il a été digéré avec l'enzyme de restriction *Bgl*III et inséré dans le vecteur pSG5 (Stratagene, La Jolla, CA) préalablement digéré avec la même enzyme et déphosphorylé 15 min à 37°C avec une phosphatase alcaline (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC). Différents rapports insert : vecteur ont été ligués avec l'ADN ligase de phage T4 (Invitrogen, Burlington, ON) toute une nuit à 15°C. Les plasmides ligués ont été transformés dans des bactéries *E. coli* DH5α ou DH10β rendues chimiquement compétentes. 100 µl de cellules compétentes et 5µl de produit de ligation ont été placés sur glace 15 min avant de subir un choc thermique de 90 sec à 42°C. Après avoir été replacé sur glace 2 minutes, 400µl de milieu de culture LB (Sigma, Oakville, ON) sans antibiotique sont ajoutés et la réaction est effectuée 20 minutes à 37°C avant d'être étalée sur un pétri LB-agar avec 50µg/ml d'ampicilline (Sigma, Oakville, ON) pour sélectionner les bactéries transformées. Les plasmides sont extraits des clones positifs par la méthode de précipitation à l'éthanol et un patron de digestion est effectué pour vérifier l'orientation de l'insert. Un fluoro-

séquençage automatique a été réalisé à l'Université d'Ottawa pour confirmer la séquence. L'insertion d'une cytosine quelques nucléotides avant l'ATG a été détectée.

3.2 GRP1 COMPLET DANS PGEX-4T2 (AA 1-399)

Une amplification PCR a été réalisée sur le plasmide GRP1-pSG5 en utilisant les amorces GRP1(pEGFP) et GRP1(B) (Tableau 2). La polymérase utilisée fut la *Pwo* (Roche Diagnostics, Laval, QC) étant donné qu'elle crée moins d'erreur que la *Taq* lors de la polymérisation de l'ADN. Le programme utilisé fut le suivant : 94°C, 2 min; (94°C, 15 sec; 55°C, 30 sec; 72°C, 1 min) X 10 cycles; (94°C, 15 sec; 55°C, 30 sec; 72°C, 45 sec + 5 sec par cycle) X 20 cycles. L'insertion de site de restriction *SalI* aux extrémités de l'ADNc nous a permis de l'introduire par digestion enzymatique au site *SalI* du site de clonage multiple de pGEX-4T2 (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC), en phase avec la séquence codant pour la glutathione-S-transférase (GST). Les techniques de ligation, transformation ainsi que la sélection des clones ont été décrites à la section 3.1. Le séquençage automatique n'a révélé aucune mutation supplémentaire.

3.2 GRP1 (CC-SEC7) DANS PSG5 (AA 1-258)

Une amplification PCR avec la polymérase *Pwo* a été réalisée sur le plasmide GRP1-pSG5 en utilisant les amorces GRP1(A) et GRP1(Sec-PH) (Tableau 1) de la même façon que décrit à la section 3.2. L'insertion de sites de restriction *BglII* aux

extrémités de l'ADNc nous a permis de l'introduire par digestion enzymatique au site *Bgl*II du site de clonage multiple du vecteur pSG5. Les techniques de ligation, transformation ainsi que la sélection des clones ont été décrites à la section 3.1. Le séquençage de la construction, à l'aide du « T7 Sequencing Kit » (USB, Cleveland, Ohio) a permis de confirmer l'orientation et l'intégrité de l'insert.

3.4 GRP1 (CC) DANS PGEX-4T2 (AA 1-88)

La construction GRP1-pSG5 a été digérée avec l'enzyme de restriction *Bam*HI pour isoler le domaine hélicoïdal et l'insérer dans le site *Bam*HI du vecteur pSG5. Les techniques de ligation et de transformation ont été décrites à la section 3.1. Le séquençage de la construction, à l'aide du « T7 Sequencing Kit » (USB, Cleveland, Ohio) a permis de confirmer l'orientation et l'intégrité de l'insert.

3.5 GRP1 (PH) DANS PGEX-4T2 (AA 285-399)

Lors du criblage, nous avons initialement isolé la région carboxy-terminale de GRP1, soit son domaine PH et sa région poly-basique. Cette région a été isolée en digérant le plasmide GRP1(PH)-pACT-2 avec les enzymes *Eco*RI et *Xho*I et insérée aux mêmes sites du vecteur pGEX-4T2. Les techniques de ligation et de transformation ont été décrites à la section 3.1. Le séquençage de la construction, à l'aide du « T7 Sequencing Kit » (USB, Cleveland, Ohio) a permis de confirmer sa séquence.

4. ESSAIS D'INTERACTION PROTÉINE-PROTÉINE

4.1 PRINCIPE DE L'ESSAI

Il existe plusieurs techniques pour étudier les interactions protéiques. La méthode par « GST pull-down » est celle que nous avons privilégiée car elle ne nécessite pas d'anticorps et est rapide. D'une part, une protéine d'intérêt est fusionnée avec la glutathione-S-transférase (GST), et purifiée à l'aide de la glutathione couplée à une bille de sépharose. Nous fabriquons ensuite une protéine marquée radioactivement au ^{35}S dans du lysat de réticulocyte de lapin, qui contient les protéines nécessaires à la transcription et à la traduction. Si les deux protéines sont mises en contact et qu'elles interagissent, nous observerons sur un autoradiogramme, après lavages, centrifugation, et suite à une migration sur un gel dénaturant, une bande à la hauteur de la protéine marquée. Des constructions plus petites peuvent également être étudiées, ce qui nous permet de cibler des régions d'intérêt sur chacune des protéines (figure 13).

4.2 PROTÉINES MARQUÉES RADIOACTIVEMENT

Les protéines marquées sont produites à l'aide du « TNT T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate System » (Promega, Nepean, ON). L'ADNc codant pour la protéine d'intérêt doit être inséré dans un vecteur d'expression eucaryote qui possède un site de reconnaissance pour la T7 polymérase. Le vecteur d'expression pSG5

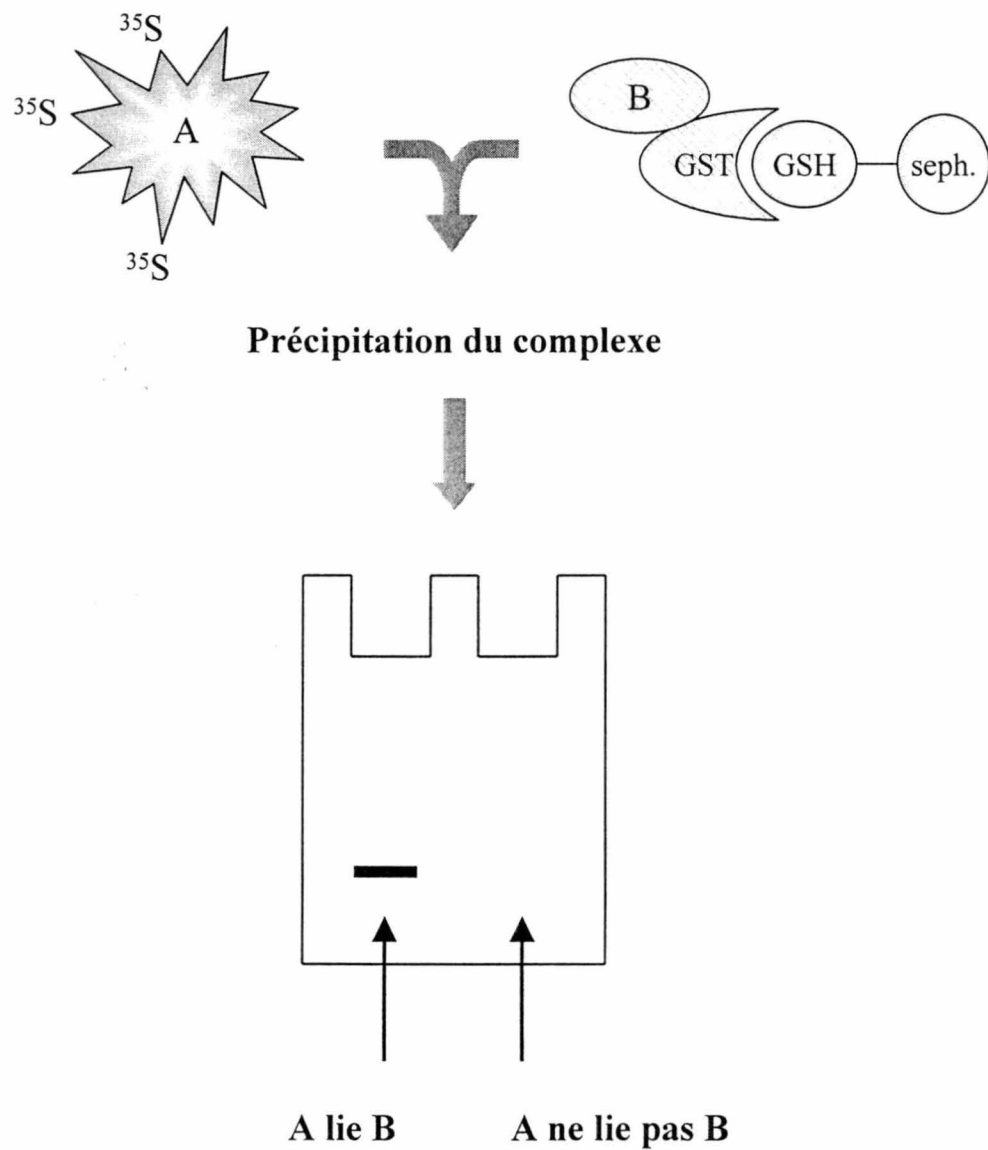


Figure 13. Représentation schématique de l'essai d'interaction « GST pull-down ». La protéine A marquée radioactivement est mise en contact avec la protéine B fusionnée à la GST et liée à la GSH couplée à une bille de Sépharose. Après précipitation et lavages, le complexe migre sur un gel dénaturant et l'autoradiographie révélera l'interaction ou non entre A et B.

(Stratagene, La Jolla, CA) a été utilisé pour insérer nos constructions. Selon les directives du fabricant, 1 µg d'ADN, 25 µl de lysat, 1 µL d'un mélange d'acides aminés sans méthionine, 1 µL de T7 polymérase et 5 µL de son tampon sont réunis. À cela, 1 µl de RNAGuardTM (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC) est ajouté pour protéger l'ARN nouvellement transcrit de se dégrader et 50 µCi de ³⁵S-Méthionine (NEN, St-Laurent, Qc) sont introduits pour permettre le marquage isotopique de la protéine. Le volume est complété à 50 µl avec de l'eau et la réaction est incubée à 30°C pendant 1 à 2 heures. Avant de les utiliser dans les essais, les protéines sont vérifiées par SDS-PAGE sur un gel d'acrylamide 10%. Celui-ci est séché et est exposé sur un film « BioMax MR » (Kodak, Rochester, NY) pour vérifier la quantité de protéines marquées produites.

4.3 PROTÉINES GST

Les ADNc des protéines d'intérêt sont introduites par enzymes de digestion dans le site de clonage multiple des vecteurs pGEX-4T1 ou pGEX-4T2, en amont du gène codant pour la Glutathione-S-transférase (GST) tel que décrit à la section 2. Le cadre de lecture de la protéine introduite doit être en phase avec celui de la GST, d'où l'utilisation préférentielle des vecteurs 4T1 ou 4T2. Le promoteur de la protéine de fusion est sous le contrôle d'un opéron-lactose, la production protéique doit donc être induite par l'ajout d'IPTG (Promega, Nepean, ON). 5 ml de milieu de culture LB (Sigma, Oakville, ON) ont été inoculés avec les bactéries contenant le plasmide d'intérêt. Le bouillon a été placé à 37°C toute une nuit avec agitation. Les bactéries

ayant atteint leur phase de latence, il est plus facile de contrôler la quantité à utiliser dans l'étape suivante. Pour procéder à une production à échelle réduite, 200 μ L de cette culture sont ajoutés à 5 mL de bouillon de culture LB. La croissance se fait à 37°C, avec agitation, jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm située entre 0,6 et 0,8. Les bactéries sont alors dans leur phase de croissance exponentielle, et la production de protéines de fusion sera maximale. L'induction protéique se fait par ajout de 0,5 mM d'IPTG. La production se fait à la température de la pièce toute une nuit, pour éviter une croissance trop rapide. Plusieurs conditions d'induction ont été étudiées (concentration d'IPTG, temps et température d'induction) et la production protéique s'est avérée maximale avec celle-ci.

Suite à l'induction, les bactéries sont récupérées par centrifugation pendant 10 min à 2000 G. Elles sont resuspendues dans 1 mL de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,02% Na-Azide, 1% Triton X-100). Une pastille d'inhibiteurs de protéases « Complete Mini, EDTA Free » (Roche Diagnostic, Laval, QC) est ajoutée à 10 mL de tampon de lyse. Les bactéries sont ensuite lysées par deux périodes de sonication de 15 sec. Les débris bactériens sont éliminés par centrifugation pendant 10 min à 2000 G et le surnageant, contenant entre autres les protéines de fusion, est récupéré. 50 μ L de billes de Sépharose-4B couplées à la glutathione (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC), préalablement lavées avec une solution phosphate saline (PBS) et resuspendues à 50% (billes/PBS), sont ajoutées au surnageant. La liaison entre la protéine de fusion GST et la glutathione couplée à la sépharose se fait à 4°C pendant 2 à 4 heures avec légère agitation. Les billes sont

ensuite centrifugées 30 sec à 2000 G et resuspendues dans le tampon de lyse. Cette étape est répétée cinq fois afin d'éliminer toutes les protéines non liées. La quantité de protéine produite est visualisée par SDS-PAGE sur un gel d'acrylamide 10% coloré au Bleu de Coomassie.

4.4 ESSAI D'INTERACTION PAR « GST PULL-DOWN »

Les protéines de fusion GST et la protéine marquée sont mises en contact dans 200 µl de tampon de liaison (40 mM Hepes, 40 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 0,5 Triton X-100, 10% Glycérol, 1,5 mM DTT) complété avec une pastille d'inhibiteurs de protéases « Complete Mini, EDTA Free » (Roche Diagnostic, Laval, QC) par 10 ml de tampon et 10 mg/ml de BSA. La quantité de protéines de fusion utilisées se situe généralement entre 20 et 30 µL. Lorsque plusieurs protéines sont comparées dans un même essai, le dosage se fait par comparaison de la densité des bandes, par un appareil analyseur d'image, après coloration au Bleu de Coomassie. Entre 5 et 10 µl de protéines marquées sont utilisés, la quantité dépend de l'intensité des bandes préalablement visualisée sur l'autoradiogramme. Un aliquot correspondant généralement à 10% de cette quantité est utilisé en contrôle lors de la migration. L'interaction entre les deux protéines se fait pendant une heure à la température de la pièce, avec légère agitation. Les billes sont ensuite centrifugées 30 sec à 2000 G et lavées dans le tampon de liaison. Cette étape est répétée 5 fois pour éliminer toutes les composantes non liées. Après être dénaturées à 95°C pendant 5 min dans un tampon d'échantillon, les protéines récupérées sont déposées sur un gel dénaturant

d'acrylamide 10%. Après séchage du gel, celui-ci est exposé sur un film « BioMax MR » (Kodak, Rochester, NY) à température de la pièce toute une nuit. La révélation de l'autoradiogramme indiquera si la protéine marquée s'est liée à la protéine de fusion.

5 EXPRESSION TISSULAIRE ET CELLULAIRE

5.1 PRÉPARATION DE LA SONDE

L'ADNc complet de GRP1, utilisé comme sonde, a été isolé en digérant la construction GRP1-pSG5 avec l'enzyme de restriction *Bgl*II. Le marquage de la sonde a été fait par la technique d'amorces aléatoires à l'aide du système « rediprime™II » (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC). De 2.5-25 ng d'ADN est dilué dans un volume final de 45 µl de tampon TE (10 mM Tris HCl pH 8.0; 1 mM EDTA) et dénaturé à 95-100°C pendant cinq minutes. Après avoir été placé sur glace 5 min, l'ADN est ajouté au tube de réaction qui contient une solution tamponnée de dATP, dGTP, dTTP, d'enzyme Klenow et d'amorces aléatoires, le tout lyophilisé pour assurer la stabilité des composantes. 5 µl de ³²P-dCTP (50 µCi) (NEN, St-Laurent, Qc) est ajouté et le mélange est incubé 30 min à 37°C. La réaction est arrêtée par l'addition de 5 µl de 0.2 M EDTA. Afin d'éliminer les nucléotides marqués non incorporés, la sonde est purifiée sur une colonne « ProbeQuant™ G-50 » (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC). Cette colonne de Sephadex retient les nucléotides libres, et le compte radioactif final de la sonde est mesuré par un compteur à scintillation (Beckman).

5.2 HYBRIDATION DU « DOT BLOT »

La membrane « Multiple Tissue Expression Array » (Clontech, Palo Alto, CA) a été préhybridée avec 10 ml de solution d'hybridation « ExpressHyb™ » (Clontech, Palo Alto, CA) à 65°C avec agitation continue pendant 30 min. Entre 10-20 X 10⁶ cpm de sonde marquée est combinée à 30 µg de C_{ot}-1 DNA (Roche Diagnostics, Laval, Qc), 150 µg d'ADN de sperme de saumon dénaturé et 50 µl de 20X SSC dans un volume total de 200 µl. Le tout est chauffé à 95-100°C pendant 5 min et ensuite placé à 68°C pour 30 min. Après incubation, la sonde est ajoutée à 5 ml de solution d'hybridation préalablement chauffée à 50-60°C. La solution d'hybridation utilisée à la préhybridation est jetée et est remplacée par la solution contenant la sonde. La membrane est hybridée toute la nuit à 65°C avec agitation et est lavée 4 fois avec la solution de lavage 1 (2X SSC, 1% SDS) à 65°C et 2 fois avec la solution de lavage 2 (0.1X SSC, 0.5% SDS) à 55°C. La membrane est finalement enveloppée de plastique et exposée sur un film « BioMax MR » (Kodak, Rochester, NY) pendant 3hres, 6hres et 12 heures à -70°C.

5.3 BUWARDAGE DE TYPE NORTHERN

20 µg d'ARN extrait à l'aide du réactif de TRIzol est chauffé 15 min à 65°C avant d'être déposé sur un gel 1% agarose, 1X MOPS et 5% Formaldéhyde 33%. Après migration, le gel est transféré par capillarité sur une membrane de nylon de type

« ZetaProbe » (BioRad, Mississauga, ON) dans une solution de 10X SSC. Suite au transfert, l'ARN est fixé aux UVs dans un Stratalinker. La sonde utilisée ainsi que la méthode d'hybridation sont les mêmes que pour le dot blot. Après hybridation, la membrane est lavée deux fois 5 min à la température de la pièce avec une solution 2X SSC, 2 fois 15 min à 65°C avec une solution 2X SSC et 1% SDS et 2 fois 15 min à la température de la pièce avec une solution 0,1X SSC. La membrane est finalement enveloppée de plastique et exposée sur un film « BioMax MR » (Kodak, Rochester, NY) toute une nuit à -70°C.

6. ESSAIS TRANSCRIPTIONNELS

6.1 CONSTRUCTIONS DES PLASMIDES UTILISÉS

Les ADNc codant pour les protéines TR α 1, TR β 1, TR β 2 et RXR α , tous clonés dans le vecteur d'expression eucaryote pSG5 (Stratagene, Windsor, ON), ont été obtenus du Dr Fredric Wondisford. Les éléments de réponse aux hormones thyroïdiennes sont couplés au gène de la luciférase dans le vecteur pA3LUC (Promega, Nepean, ON). L'élément de réponse positif (pTRE) TRETK correspond à l'agencement idéalisé de trois palindromes précédant le promoteur minimal de la thymidine kinase (Adams et al., 1994). Le pTRE LYSX2 contient deux copies d'un palindrome inversé contenu dans le promoteur du gène du lysozyme de poulet (Adams, Matthews et al., 1994). L'élément de réponse négatif (nTRE) TRH est constitué d'une portion du promoteur, soit les nucléotides -900 à +55 (Hollenberg et

al., 1995) et celui de la sous-unité alpha de la TSH contient les nucléotides -846 à +26 (Chatterjee et al., 1989). L'extraction plasmidique de ces vecteurs se fait sur des colonnes échangeuses d'anion à l'aide du « Qiagen Plasmid Maxi Kit » (Quiagen, Mississauga, ON).

6.2 CULTURE CELLULAIRE ET TRANSFECTION

Les cellules CV-1 (ATCC) sont maintenues dans un milieu DMEM (Invitrogen, Burlington, ON) supplémenté avec 10% FBS, 1% antibiotiques/antimycotiques, 2 mM L-Glutamine dans un environnement à 37°C contrôlé à 5% CO₂. Divisées dans des plaques de 6 puits, les cellules sous-confluentes sont transfectées de façon transitoire à l'aide du « Mammalian Cell Transfection Kit » (Speciality Media, Phillipsburg, NJ), qui utilise la technique de précipité au phosphate de calcium. Le précipité adhère aux cellules et déstabilise leur membrane permettant ainsi l'entrée des plasmides. Pour chaque expérience, 10 µg par 6 puits du gène rapporteur sont cotransfectés à 500 ng de plasmides d'intérêt, sauf pour les expériences utilisant des doses variables de plasmides. 16 heures après la transfection, le milieu de culture est remplacé par un milieu rendu déficient en hormones thyroïdiennes par un traitement sur une résine échangeuse d'anions et au charbon. Les cellules transfectées sont traitées avec 10 nM de T₃ (Sigma, Oakville, ON) diluée dans dans 40 mM NaOH ou une solution contrôle de 40 mM NaOH.

6.3 ESSAI TRANSCRIPTIONNEL

Après 36 à 40 heures, les cellules sont lysées dans 300 μ L de tampon de lyse (25 mM Gly-Gly, 15 mM MgSO_4 , 4 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2 mM DTT) et décollées mécaniquement. Le dosage de l'activité luciférase est réalisé sur un luminomètre (Berthold Lumat LB 9507). Lors de l'essai, 150 μ L de luciférine (750 μ M) (Molecular Probes, Eugene, OR) et 150 μ L de solution d'essai (25 mM Gly-Gly, 15 mM MgSO_4 , 4 mM EGTA, 15 mM KPO_4 -dibasique, 3 mM DTT, 60 mM ATP) sont injectés automatiquement à 200 μ L du lysat cellulaire. Chaque expérience est réalisée en triplicata et au moins 3 expériences indépendantes ont été effectuées. Lors des essais utilisant 100 nM de wortmanine (Sigma, Oakville, ON) et 0,1 ou 1 μ M de L2940002 (Calbiochem, San Diego, CA), les cellules sont traitées 30 min avant l'ajout d'HTs. Le principe de la technique est représenté schématiquement à la figure 14.

7. ESSAI DE RÉTENTION SUR GEL

La technique de rétention sur gel permet de visualiser l'interaction entre des protéines et l'ADN. Une sonde composée d'un fragment d'ADN marqué radioactivement est mise en contact avec une ou plusieurs protéines. La liaison d'une protéine ou plus retardera différenciellement la migration du fragment d'ADN sur un gel non-dénaturant, ce qui s'observera par une hauteur de bande variable sur un autoradiogramme (figure 15).

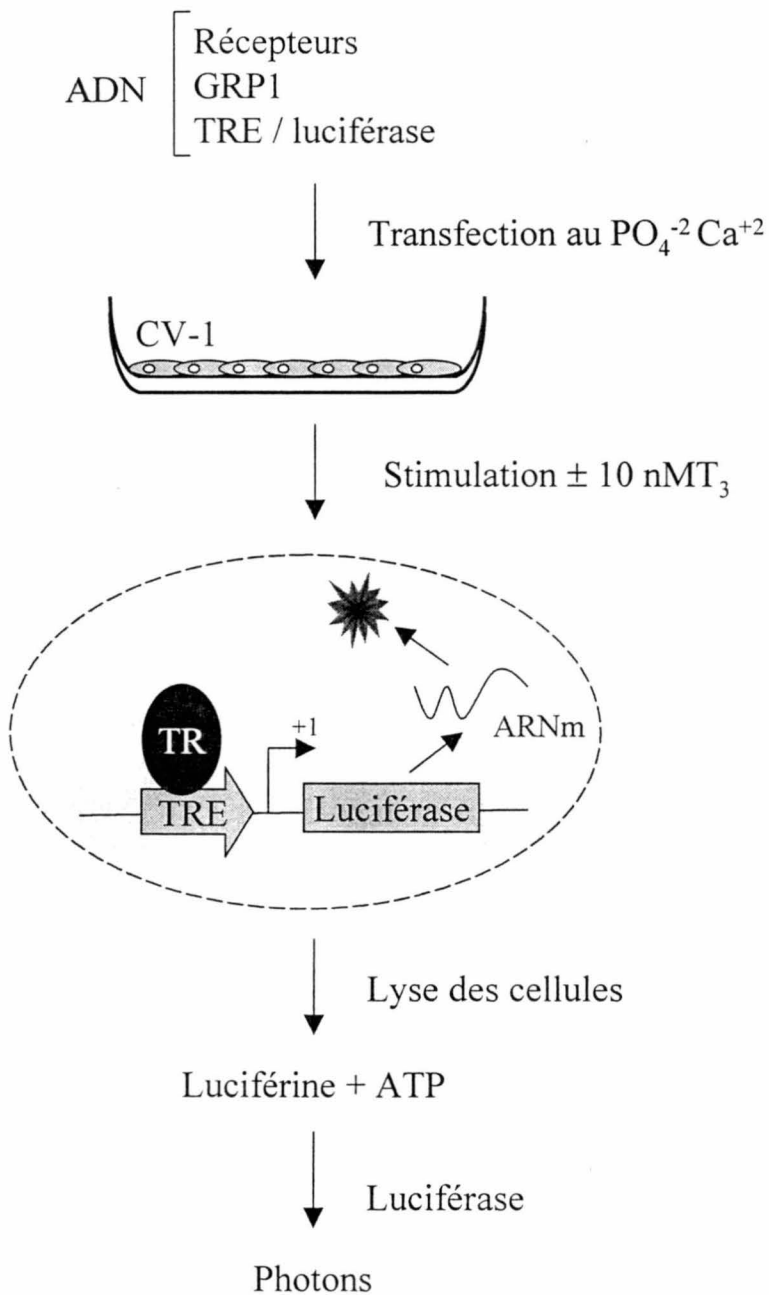


Figure 14. Représentation schématique de l'essai transcriptionnel. Les ADNs d'intérêts sont transfectés dans les cellules CV-1 à l'aide de la méthode de précipité au $\text{PO}_4^{-2} \text{Ca}^{+2}$. Après stimulation ou non, les TRs activent la transcription de luciférase qui sera dosée avec un luminomètre après lyse cellulaire. La quantité de photons produite sera directement proportionnelle à l'activité du promoteur étudié.

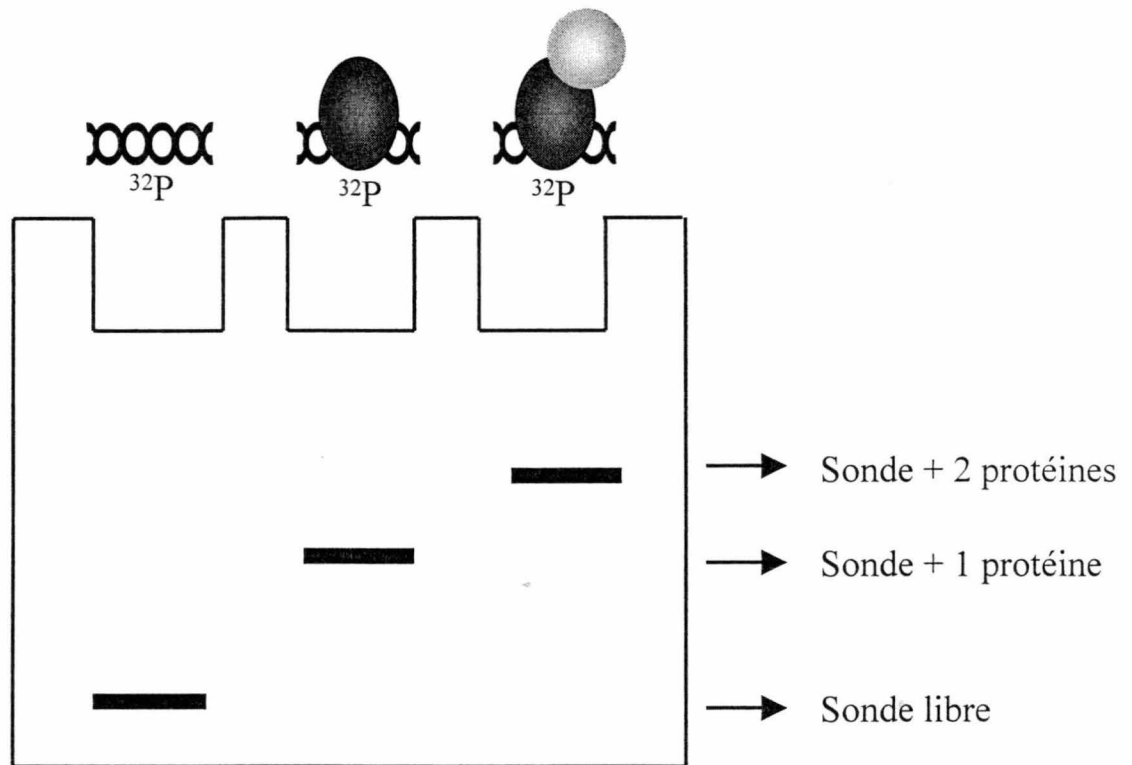


Figure 15. Représentation schématique de l'essai de rétention sur gel. La sonde marquée correspond à un fragment d'ADN. Une protéine qui reconnaît cette séquence s'y lie et retarde la migration de la sonde. Si la seconde protéine reconnaît la première, le complexe de taille plus grande retardera davantage la migration.

7.1 PRÉPARATION DE LA SONDE

La sonde correspondant au pTRE DR+4 est marquée radioactivement par l'incorporation du nucléotide dCTP couplé au ^{32}P (NEN, St-Laurent, QC) dans une réaction d'amplification par PCR. 0,6 μM d'amorces se chevauchant sont ajoutées à un mélange de 200 μM de dGTP, dATP, dTTP, 50 μCi ^{32}P -dCTP (NEN, St-Laurent, Qc) 1,25 unités de Taq polymérase (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC), 5 μl de son tampon dans un volume final complété à 50 μl avec de l'eau. L'amplification se fait comme suit : 95°C, 5 min; (94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 72°C, 30 sec) X 20 cycles. Les nucléotides marqués non incorporés dans la sonde sont éliminés sur une colonne « ProbeQuant™ G-50 » (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Qc) et le compte de la sonde est mesuré par scintigraphie.

7.2 PRÉPARATION DES PROTÉINES

Les protéines sont transcrites et traduites *in vitro* par la méthode de réticulocyte de lapin comme décrit précédemment à la section 4.2. La présence du nucléotide marqué est toutefois remplacée par un mélange d'acides aminés complet, non radioactifs.

7.3 ESSAIS DE RÉTENTION SUR GEL

Entre 1 et 7 μ l de protéines fabriquées *in vitro* sont incubées en présence de 1×10^6 cpm de sonde dans 200 μ l de tampon de liaison (20 mM Hepes, 50 mM KCl, 20% Glycérol, 1 μ g/ μ l DIDC, 1 mM DTT, 0,1 mg/ml de sperme de saumon) pendant 20 min à température de la pièce. Les volumes totaux de protéines sont complétés avec du lysat seul, pour assurer un volume final équivalent. Les produits de réaction sont déposés sur un gel non-dénaturant 5,2% acrylamide avec glycérine, et la migration est réalisée à 150V pendant 3 heures. Le gel est ensuite séché et exposé sur un film « BioMax MR » (Kodak) toute une nuit à -70°C .

IV. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

1. CRIBLAGE DOUBLE-HYBRIDE

Depuis quelques années, le criblage double-hybride dans la levure est utilisé abondamment pour identifier de nouvelles interactions protéiques. Nous avons employé l'ensemble « Matchmaker System II » de Clontech pour identifier de nouveaux partenaires d'interaction pour les récepteurs des hormones thyroïdiennes. Comme décrit dans la section 1.2 des « matériel et méthodes », l'appât que nous avons construit était constitué d'une portion de la région amino-terminale de TR β 2 responsable de sa spécificité dans la régulation négative ainsi que son domaine de liaison à l'ADN en entier. Une librairie d'ADNc de cerveau fœtal humain fut criblée avec cet appât.

Après avoir vérifié que l'activité intrinsèque de notre appât et de notre librairie était nulle, que les contrôles négatifs et positifs répondaient adéquatement au système et après avoir déterminé la quantité optimale de 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) à utiliser, nous avons finalement co-transformé les levures Y190 avec les vecteurs de notre appât et de la librairie. De cette première sélection sur milieu déficient en tryptophane, leucine et histidine, où seules les levures possédant à la fois les deux vecteurs qui codent pour des protéines qui interagissent ensemble, nous nous sommes retrouvés avec une très grande quantité de clones positifs. Cela suggère qu'une concentration de 25 mM de 3-AT n'était peut-être pas suffisante pour contrer

l'activité du promoteur fuyant de l'histidine, ce qui entraîne une production d'histidine sans la reconstitution du facteur de transcription Gal4. De nombreux clones faussement positifs ont ainsi été créés. Cependant, les essais β -galactosidase sur filtre nous ont permis d'identifier 19 clones qui ont répondu positivement à la double sélection.

Par la suite, nous avons extrait l'ADN plasmidique de ces 19 clones et nous avons introduit ces vecteurs par transformation dans des bactéries *E. Coli* MC106. Cette souche bactérienne est déficiente en leucine ce qui nous permet de sélectionner spécifiquement les vecteurs pACT-2 contenant les ADNc codant pour les protéines de la librairie. Contrairement aux levures qui ont la possibilité d'accepter plusieurs plasmides, les bactéries ne peuvent en accepter qu'un seul. Cette étape nous permet ainsi d'isoler spécifiquement les vecteurs de la librairie présents dans les clones positifs. Seulement 16 clones ont pu être récupérés à cette étape. Les divisions répétées de levures ou de bactéries peuvent entraîner la perte des plasmides, ce qui pourrait expliquer cette diminution du nombre de clones positifs. Des clones faussement positifs ont également pu être éliminés à cette étape.

Il était par la suite essentiel de reconfirmer *in vivo* l'interaction entre l'appât et ces protéines sélectionnées. Une co-transformation dans les levures Y190 nous a permis de confirmer positivement 8 de ces clones. Nous sommes finalement passés à l'étape du séquençage pour identifier ces nouveaux partenaires d'interaction pour TR β 2. Pour des raisons qu'on ignore, seuls 6 de ces clones ont pu être séquencés. Il est possible

que des structures secondaires de l'ADNc ou des modifications de l'ADN par la levure aient pu nuire à la réaction de séquençage. Nous avons finalement comparé les séquences obtenues dans les banques de données à l'aide du moteur de recherche « BLAST » afin d'identifier les nouveaux partenaires d'interaction pour les TRs. Seul le clone 14C ne possède pas d'homologue et constitue une nouvelle protéine non répertoriée. Aucune des protéines identifiées n'avait été décrite dans la littérature pour interagir avec les TRs.

2. ISOLATION DE GRP1

Il arrive fréquemment qu'à la suite du criblage d'une librairie d'ADNc, on se retrouve avec des séquences incomplètes : lors de la création d'une banque d'ADNc, la transcriptase inverse débute son action en 3' de l'ARNm et si un événement survient, tel un temps d'élongation trop court ou la présence d'une structure secondaire de l'ARNm, on se retrouve avec une séquence codant pour la fin d'une protéine. Cette situation fut constatée pour trois de nos clones, dont GRP1 qui ne possédait que son domaine PH, sa région polybasique et une portion d'ADN non codant. Cette région était homologue à 100% avec la séquence originale de GRP1, telle que décrit dans « Genbank » au numéro d'accèsion AJ005197. À l'aide de la séquence décrite dans la littérature, nous avons conçu deux amorces spécifiques afin d'amplifier l'ADNc complet de GRP1 par RT-PCR à partir d'un extrait d'ARN de lignée cellulaire JEG-3, des cellules issues d'un choriocarcinome humain. Suite à l'amplification par PCR, une bande à une hauteur d'environ 1,2 kilobases

correspondant à nos prévisions a été purifiée et insérée à l'aide d'enzymes de restriction dans un vecteur d'expression tel que décrit dans la section « matériel et méthodes ». Le fluoro-séquençage de cette construction a confirmé qu'il s'agissait bel et bien de GRP1.

3. ESSAIS D'INTERACTIONS

3.1 GRP1 RECONNAÎT LE DOMAINE DE LIAISON À L'ADN DE TR β 2

Il existe plusieurs techniques pour étudier les interactions protéiques. La méthode par « GST pull-down » est celle que nous avons privilégiée car elle ne nécessite pas d'anticorps et est relativement rapide. Nous avons d'abord confirmé que TR β 2 de type sauvage (TR β 2wt) interagissait bien avec GRP1 (figure 16b). La GST seule lie très faiblement GRP1, ce qui indique que la liaison est spécifique entre les deux protéines d'intérêt. Nous possédions ensuite une construction de TR β 2, dans laquelle les acides aminés 89 à 116 avait été enlevés (TR β 2(Δ 89-116)) (figure 16a). Notre appât contenant les acides aminés 89 à 220, l'interaction observée entre TR β 2(Δ 89-116) et GRP1 indique que la reconnaissance entre les deux protéines se fait au niveau des acides aminés 117 à 220, qui correspondent au domaine de liaison à l'ADN du récepteur (figure 16b).

Le domaine de liaison à l'ADN est très conservé entre les isoformes des TRs, mais également à travers les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. Il était

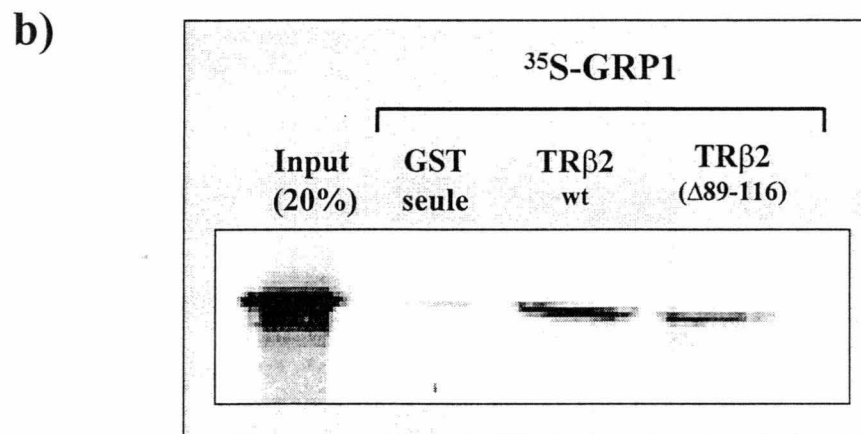
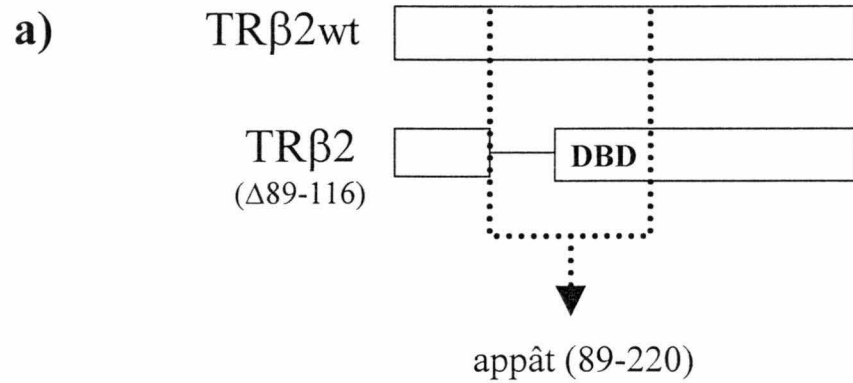


Figure 16. La liaison entre GRP1 et TR β 2 se fait sur le DBD du récepteur. a) Schématisation des constructions utilisées. b) Essai d'interaction par GST pull-down entre GST-TR β 2, GST-TR β 2(Δ 89-116) et ³⁵S-GRP1.

donc pertinent d'aller vérifier la liaison de GRP1 d'abord avec les isoformes actives TR α 1 et TR β 1. À la figure 17, on observe une faible interaction entre GRP1 et ces deux isoformes ; interaction absente avec la GST seule. Il est fréquent d'observer plusieurs hauteurs de bandes lors de la fabrication de protéines *in vitro*, ceci serait probablement la conséquence d'une dégradation protéique partielle, d'un arrêt prématuré de la transcription ou de la traduction. D'autre part, on constate la même interaction entre GRP1 et le récepteur à l'acide 9*cis*-rétinoïque (RXR α) et celui à l'œstrogène (ER α). Cependant, on ne dénote aucune liaison entre GRP1 et le récepteur à l'acide rétinoïque (RAR α). On peut alors poser deux hypothèses : a) bien que le DBD des RNs soit très conservé, il est possible que les acides aminés reconnus soient absents chez RAR α ou b) l'essai n'est pas assez sensible pour révéler une faible interaction. D'ailleurs, l'intensité de l'interaction entre GRP1 et RXR α est également très faible, malgré le fait qu'une très grande quantité de protéines marquées ait été mise en contact avec GRP1.

3.2 LA RÉGION CARBOXY-TERMINALE DE GRP1 EST RECONNUE PAR LES TRS

Afin de déterminer plus exactement le site d'interaction du récepteur sur GRP1, nous avons fabriqué plusieurs constructions représentant les différents domaines de la protéine (figure 18a). On peut remarquer que les constructions contenant le domaine hélicoïdal seul ainsi que lié au domaine Sec7 reconnaissent très bien TR β 2 (figure 18b). Ce n'est pas étonnant dans l'optique où le domaine hélicoïdal agit comme site d'interaction pour plusieurs protéines. Ce qui est davantage intéressant, c'est de

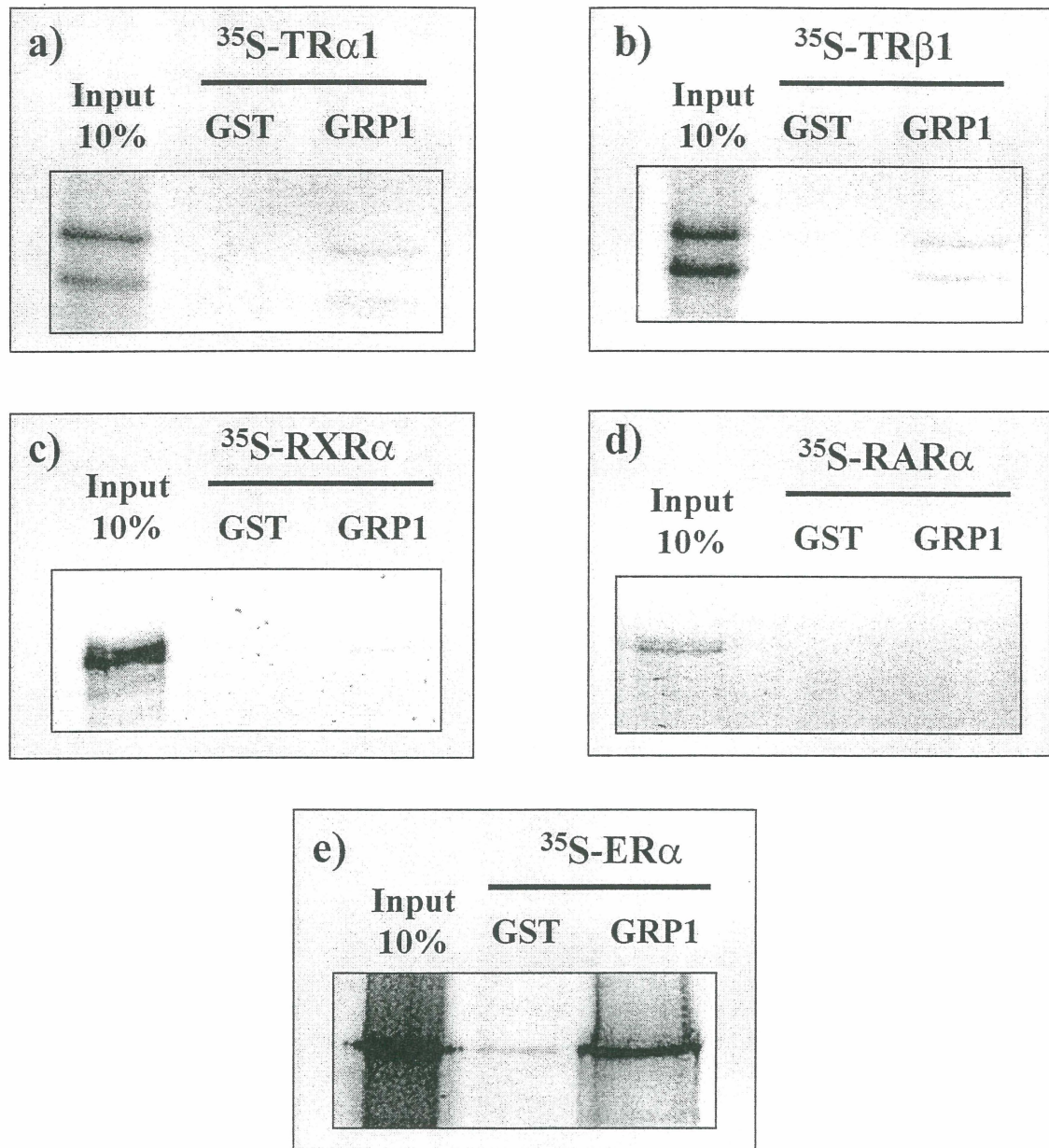


Figure 17. GRP1 reconnaît d'autres récepteurs nucléaires. Essais d'interaction par GST pull-down entre GST-GRP1 et *a)* TR α 1, *b)* TR β 1, *c)* RXR α , *d)* RAR α et *e)* ER α

a)

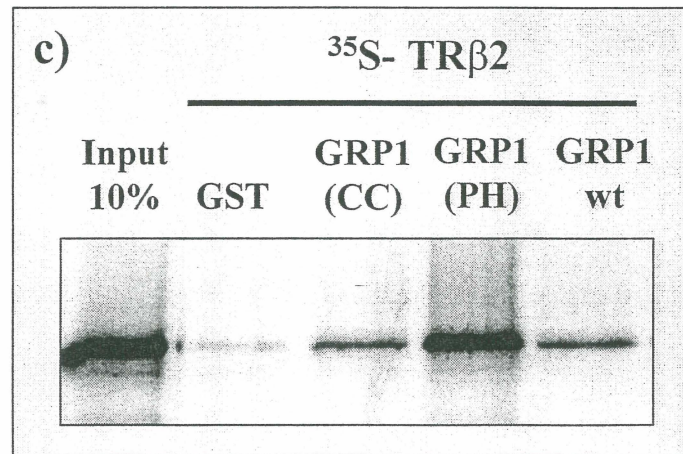
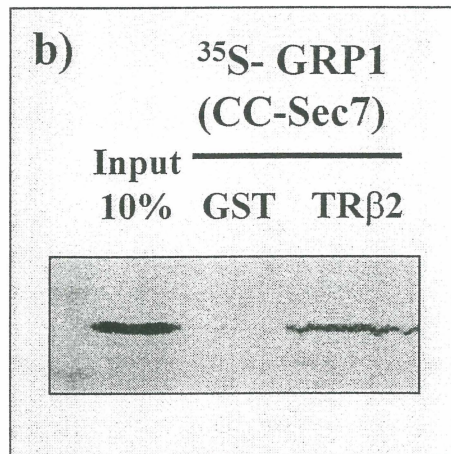
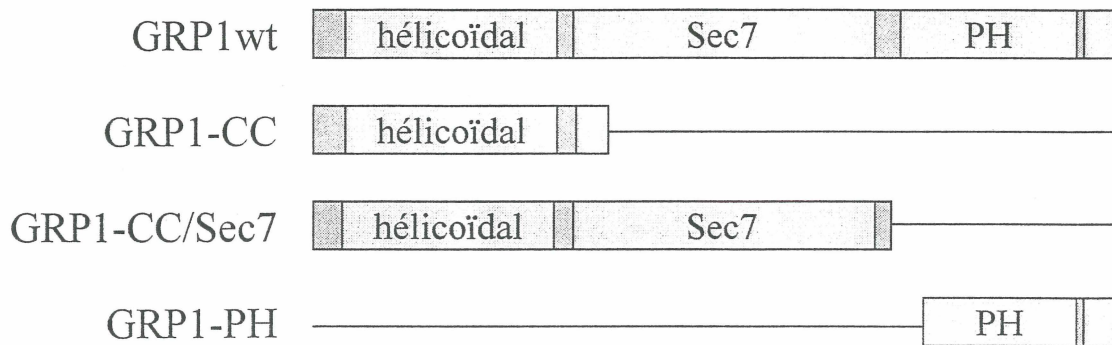


Figure 18. Localisation des sites d'interaction entre TRβ2 et GRP1. a) Schématisation des constructions utilisées. b) Essai d'interaction par GST pull-down vérifiant l'interaction entre TRβ2 couplé à la GST et la construction ³⁵S-GRP1(CC-Sec7). c) Utilisation des mutants GRP1(CC) et PH couplés à la GST dans un essai d'interaction avec ³⁵S-TRβ2

constater que le domaine PH, comprenant également la région polybasique, interagit beaucoup plus fortement que les autres domaines (figure 18c). On s'attendait cependant à ce résultat, étant donné qu'il s'agit de cette portion qui fut initialement identifiée lors du criblage double-hybride. De plus, la forte intensité de cette liaison comparée avec celle de GRP1 de type sauvage s'expliquerait par la conformation tertiaire de la protéine. Effectivement, le domaine PH seul a probablement ses sites de reconnaissance beaucoup plus disponibles pour le récepteur que dans sa conformation native.

3.3 INFLUENCE DU LIGAND DANS L'INTERACTION GRP1-TR

Finalement, nous nous sommes intéressés à l'effet de la liaison du ligand sur l'interaction *in vitro* entre GRP1 et TR β 2. En utilisant des concentrations croissantes de T₃, nous pouvons constater à la figure 19 que la présence ou non de T₃ ne semble pas modifier l'intensité de la liaison entre les deux protéines. Ces résultats corréleront bien avec ce qui est observé dans nos essais transcriptionnels et qui sera décrit subséquemment.

En résumé, à cette étape, nos observations ont i) confirmé l'interaction entre GRP1 et les TRs ainsi que d'autres RNs, ii) localisé le site de liaison au niveau du DBD de TR β 2, iii) localisé le site de liaison au niveau des domaines PH et polybasique de GRP1 et iv) montré la probable indépendance de la liaison du ligand dans l'interaction protéique.

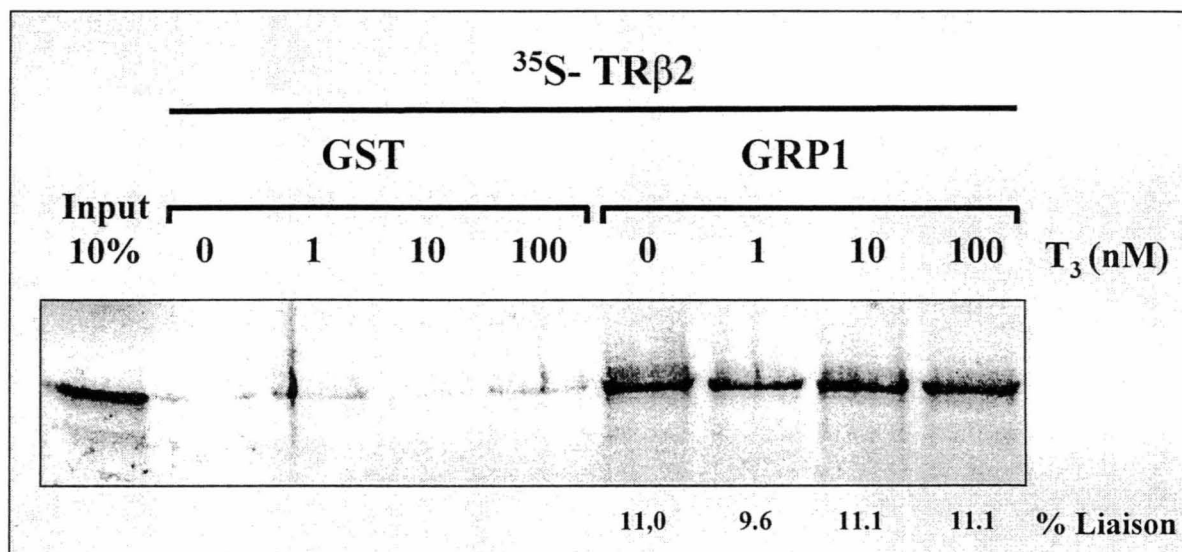


Figure 19. La liaison entre TRβ2 et GRP1 est indépendante de la liaison du ligand. Essai d'interaction par GST pull-down vérifiant l'interaction entre GRP1 couplé à la GST et ³⁵S-TRβ2 en absence ou en présence de 0, 1, 10 et 100nM de T₃. Le pourcentage de liaison est calculé par densitométrie en comparaison avec l'intensité de la bande correspondant à 10% de la quantité de protéines marquées utilisées dans l'essai.

4. EXPRESSION TISSULAIRE ET CELLULAIRE DE GRP1

Étant donné la rareté des données publiées sur cet aspect, il était intéressant dans la caractérisation initiale de cette nouvelle interaction de localiser les sites d'expression de la protéine GRP1, qui pourrait aussi nous donner des indices quant à la fonction physiologique du complexe TR-GRP1. Pour ce faire, nous avons utilisé un « dot blot » commercial contenant l'ARN de nombreux tissus et lignées cellulaires humaines. Nous avons hybridé cette membrane avec une sonde composée de la séquence entière de GRP1. Les résultats de la figure 20 montrent que l'ARNm est exprimé de façon ubiquiste chez l'humain avec des niveaux d'expression peu variables. Cependant, on peut noter une plus forte expression de la protéine dans le placenta et les testicules ainsi qu'une lignée cellulaire colorectale. Dans la colonne des contrôles, on constate que la sonde a également reconnu l'ADN de la bactérie *Escherichia coli*. Le domaine Sec7 de GRP1 est une région qui a été initialement identifiée chez la levure et qui est présente chez de nombreuses espèces, dont les végétaux et les protozoaires. Il n'est donc pas surprenant de retrouver la présence de telles protéines chez ce micro-organisme.

L'hybridation par « Northern blot » (figure 21) nous montre également que l'ARNm de GRP1 est fortement exprimé dans la totalité des cellules humaines utilisées au laboratoire, soit les cellules utérines (HeLa), placentaires (JEG-3) et rénales (HEK). Les cellules rénales de singe (CV-1) ainsi que les cellules PC12, issues d'un phéochromocytome de rat, expriment également l'ARNm de GRP1

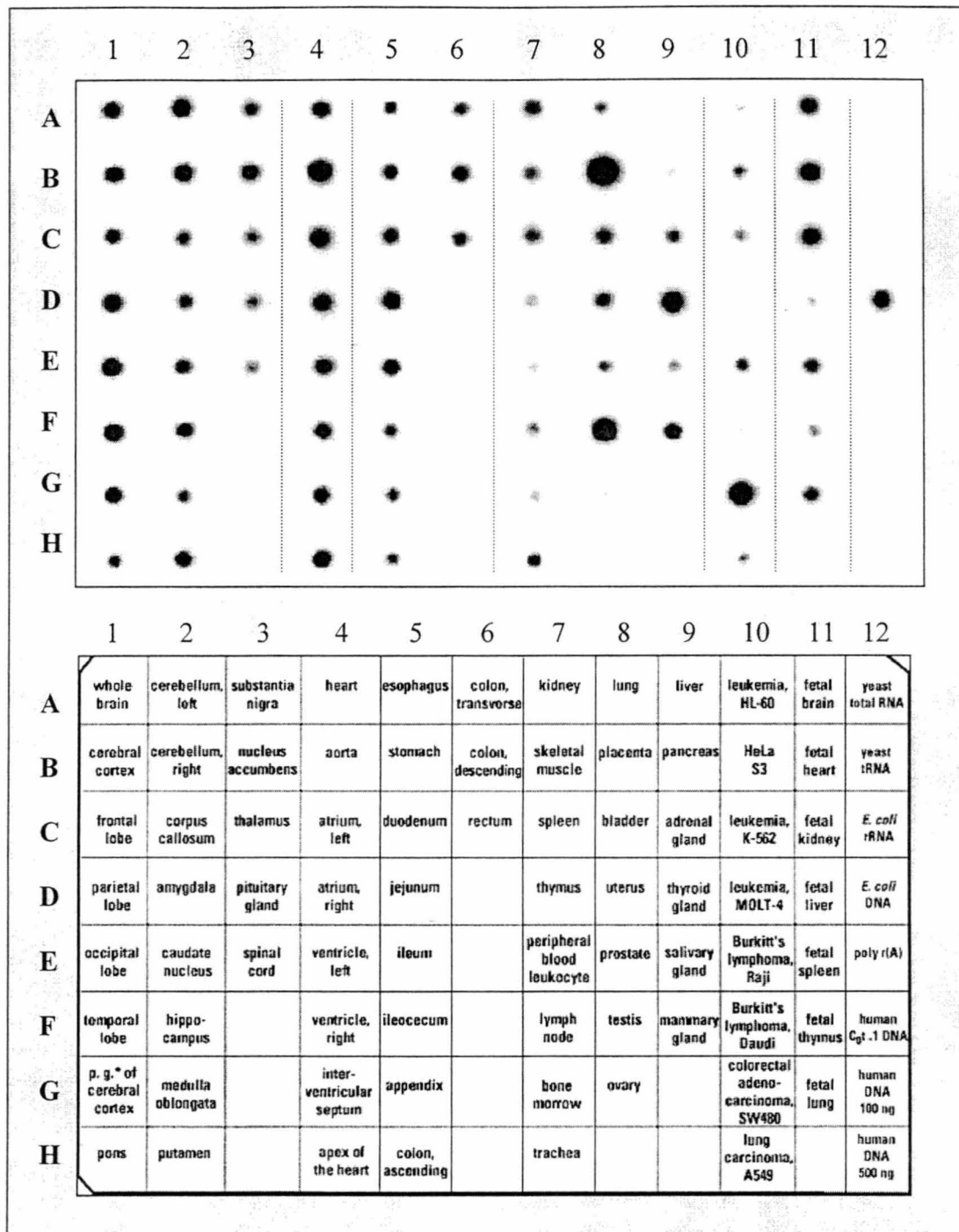


Figure 20. Expression de GRP1 dans les tissus et lignées cellulaires humaines. Hybridation d'un dot blot commercial (Clontech) avec la sonde utilisant l'ADNc complet de GRP1.

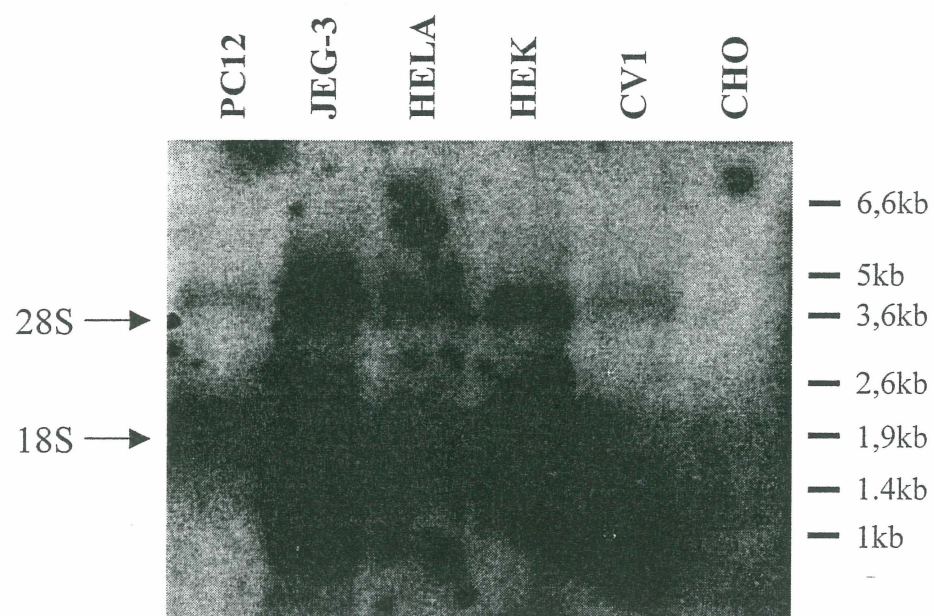


Figure 21. Expression de GRP1 dans des lignées cellulaires. Hybridation d'un Northern blot avec la sonde utilisant l'ADNc complet de GRP1. L'ARNm de GRP1 a une longueur de 4,5kb.

quoique plus faiblement, tandis que les cellules ovariennes de hamster (CHO) ne semble pas l'exprimer, même après une très forte exposition de la membrane. Sur l'autoradiogramme, on décèle très clairement la bande correspondant à l'ARNm de GRP1 à une hauteur de 4,5kb. Cependant, on remarque également que la sonde se lie à des ARNm de plus petites tailles, qui pourraient correspondre aux ARNm codant pour les protéines ARNO et cytohéline-1, qui possèdent environ 80% d'homologie avec GRP1.

5. ESSAIS TRANSCRIPTIONNELS

5.1 EFFET DE GRP1 SUR DES pTRES

Les récepteurs nucléaires étant des facteurs de transcription, nous avons vérifié la possibilité que GRP1 ait le potentiel de moduler la réponse des récepteurs des hormones thyroïdiennes. Nous avons donc procédé à des essais transcriptionnels dans les cellules CV-1 en utilisant le gène rapporteur de la luciférase, tels que décrits dans la section « matériel et méthodes ». À la figure 22a, toutes les données sont rapportées sur l'activité basale de la cellule, soit la valeur obtenue après transfection du vecteur pSG5 vide et de l'élément de réponse positif TRETK, en absence de T_3 . TRETK est un arrangement idéalisé de trois palindromes permettant une forte régulation positive, par les TRs. En absence de GRP1, on constate d'abord qu'il y a une activité intrinsèque de la cellule par une activation transcriptionnelle de 5X en présence de T_3 , malgré l'absence de TRs transfectés. Cette observation suggère la présence, bien que

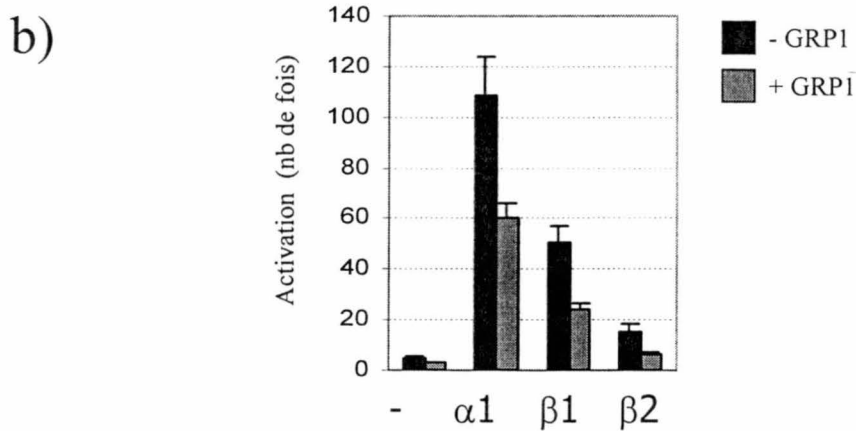
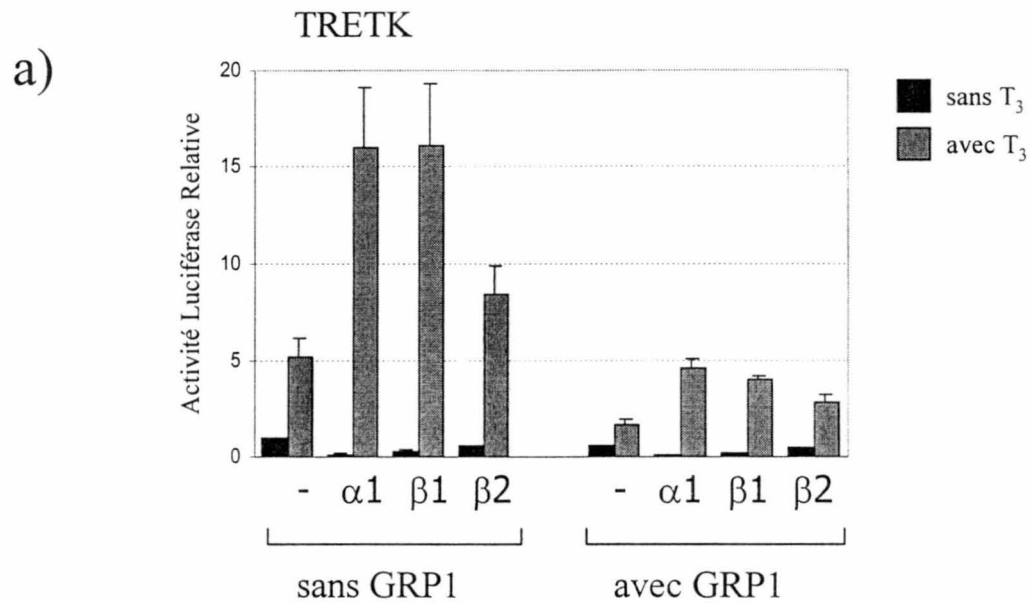


Figure 22. GRP1 diminue la transcription de toutes les isoformes des TRs sur l'élément de réponse positif idéalisé TRETK. *a)* Les valeurs obtenues sont représentées en activité relative, i.e. par comparaison avec la valeur du vecteur vide en absence de T_3 . *b)* Les valeurs obtenues sont représentées en amplitude d'activation de l'isoforme en présence de T_3 .

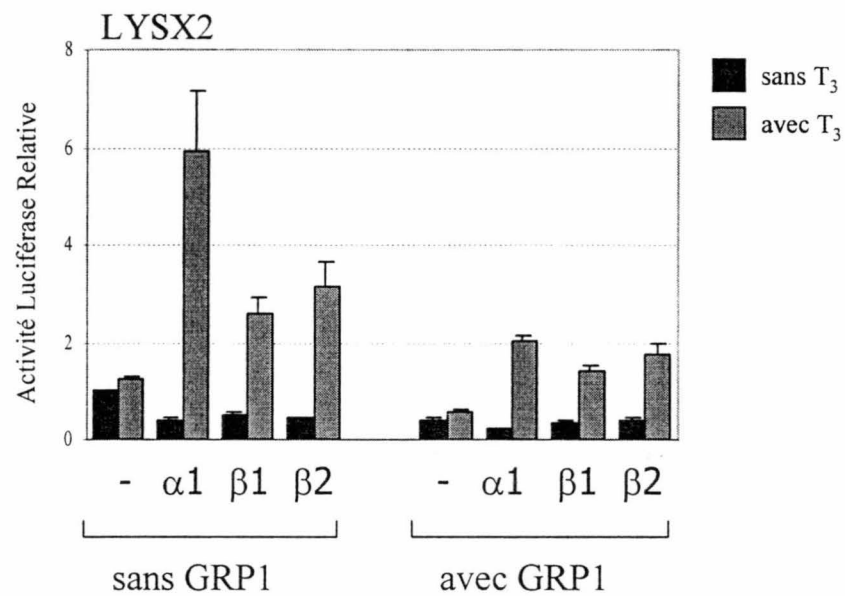
très faible, de TRs endogènes dans les cellules CV-1. Ensuite, on constate que la présence des isoformes TR α 1, β 1 et β 2 entraîne une baisse de la transcription en dessous de l'activité basale de la cellule en absence de T₃, ce qui correspond à l'activité répressive des récepteurs. L'ajout de l'hormone active fortement la transcription pour les isoformes α 1 et β 1, et un peu plus faiblement pour β 2. Ces résultats concordent très bien avec ce qui est décrit dans la littérature (Safer et al., 1997).

Il est facile de constater que l'ajout de GRP1 diminue l'activité transcriptionnelle globale des trois isoformes et même du vecteur vide, soit des TRs endogènes. Les valeurs relatives en absence ou en présence de T₃ sont toutes plus faibles lorsque GRP1 est ajoutée. La protéine influence également l'activité intrinsèque des récepteurs : celle-ci est diminuée d'environ 50% en présence de GRP1 pour tous les TRs (figure 22b). Ces résultats suggèrent que GRP1 n'affecte pas l'activité répressive ou activatrice des TRs de façon spécifique, mais bien l'ensemble de son action, et ce pour les trois isoformes actives des TRs. Les mêmes constatations ont été faites pour l'élément de réponse positif LysX2 (figure 23), bien que l'effet de GRP1 semble plus faible sur ce TRE.

5.2 EFFET DE GRP1 SUR DES nTRES

Le gène de la TRH et des sous-unités de la TSH, comme mentionné dans l'introduction, sont régulés négativement par les TRs. Ainsi, on peut observer aux

a)



b)

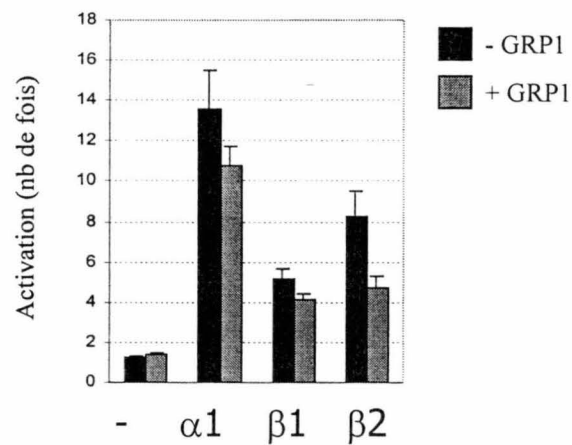


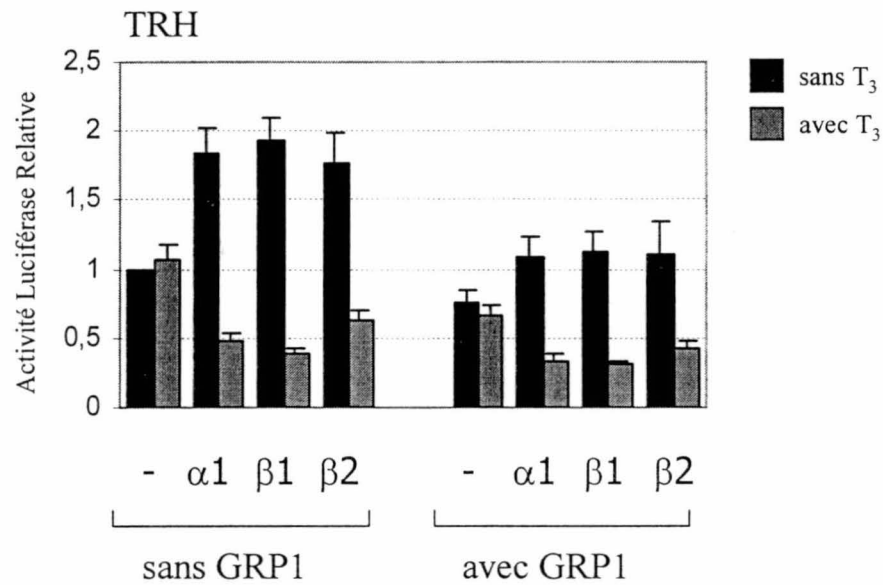
Figure 23. GRP1 diminue la transcription de toutes les isoformes des TRs sur l'élément de réponse positif LYSX2. *a)* Les valeurs obtenues sont représentées en activité relative, i.e. par comparaison avec la valeur du vecteur vide en absence de T_3 . *b)* Les valeurs obtenues sont représentées en amplitude d'activation de l'isoforme en présence de T_3 .

figures 24 et 25, qu'en absence de T_3 et de GRP1, les trois isoformes des TRs activent la transcription, mais qu'elle la réprime en présence de T_3 . L'ajout du RXR dans ces essais potentialise l'activité des TRs, comme nous avons décrit précédemment dans notre laboratoire (Laflamme, soumis 2001). L'action de GRP1 sur les nTREs est semblable à celle décrite pour les pTREs : on observe effectivement une diminution globale de l'activité relative pour les 3 isoformes ainsi qu'une diminution de la répression des récepteurs et ce pour les deux éléments de réponse étudiés.

5.3 COURBE DOSE-RÉPONSE GRP1

Les observations précédentes pourraient indiquer que la diminution globale de tous les taux transcriptionnels ne soit que la conséquence d'une trop grande quantité d'ADN transfectée, empêchant une régulation efficace par les TRs. Ce phénomène appelé « squelching » est dû à l'encombrement des machineries transcriptionnelles et traductionnelles cellulaires par une trop grande quantité d'ADN plasmidique. Pour vérifier cette possibilité, nous avons transfecté les cellules avec une concentration croissante de GRP1, allant de 50 ng d'ADN pour 6 puits à 500 ng. À la figure 26, on observe que la réponse de TR β 1 diminue graduellement avec l'ajout d'une dose croissante de GRP1. La quantité croissante d'ADN transfectée n'affecte toutefois pas l'activité de TR β 1. Ces résultats indiquent que nos observations ne seraient pas dues à un phénomène de « squelching », mais bien à un effet spécifique de GRP1 sur les TRs, car l'effet répressif de GRP1 est observé même à de faible quantité d'ADN transfecté.

a)



b)

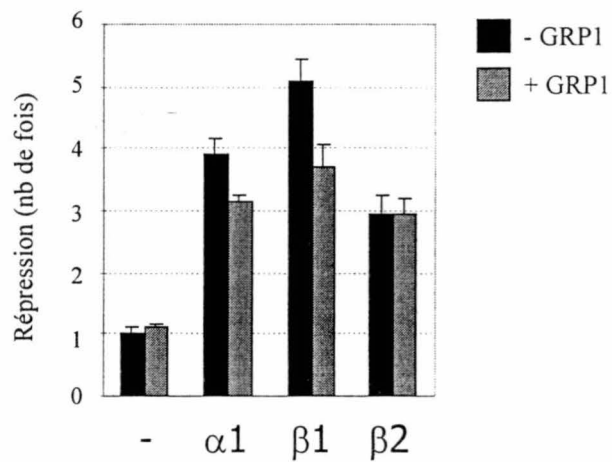


Figure 24. GRP1 diminue la transcription de toutes les isoformes des TRs sur l'élément de réponse négatif TRH. a) Les valeurs obtenues sont représentées en activité relative, i.e. par comparaison avec la valeur du vecteur vide en absence de T_3 . b) Les valeurs obtenues sont représentées en amplitude de répression de l'isoforme en présence de T_3 .

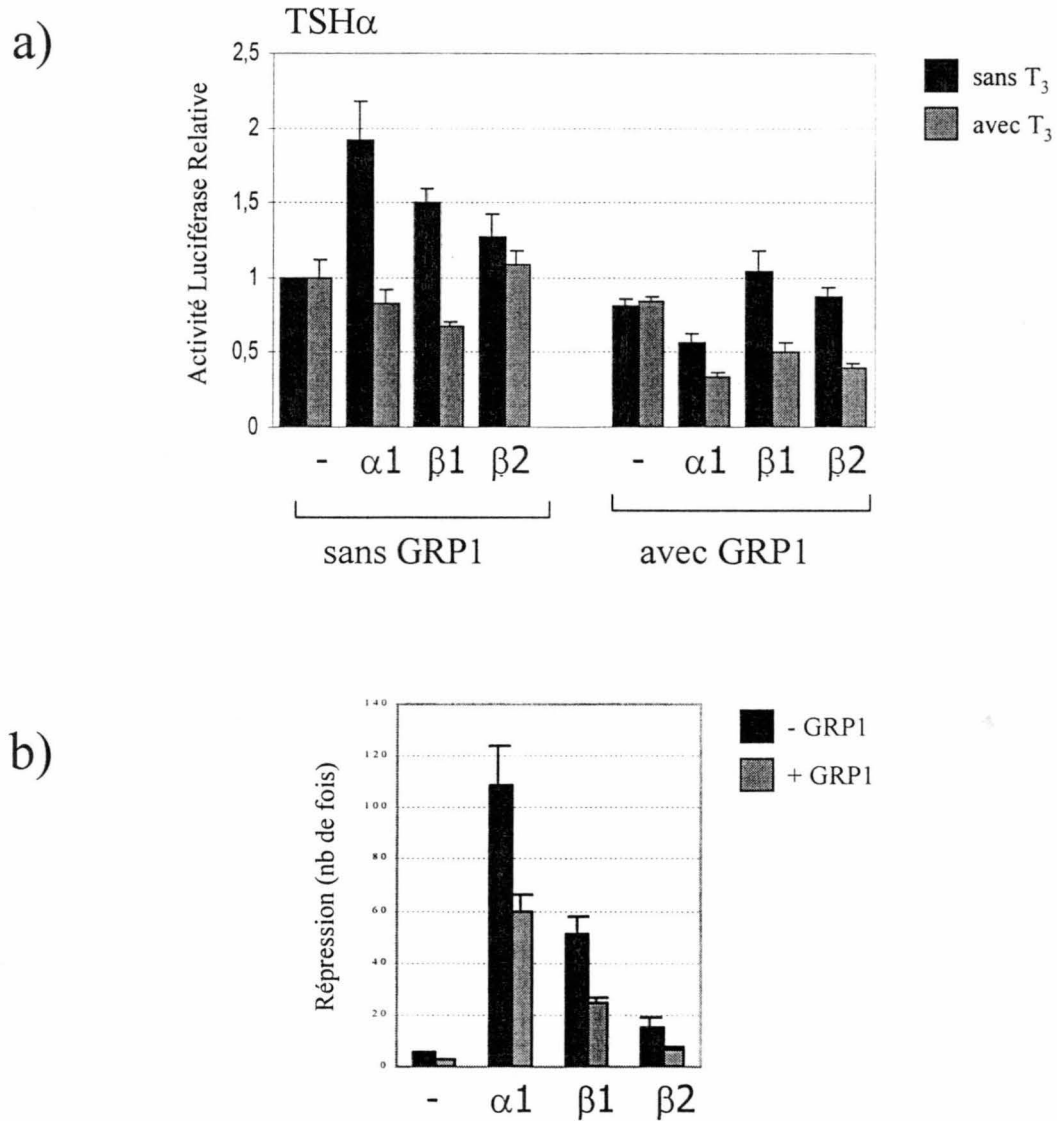


Figure 25. GRP1 diminue la transcription de toutes les isoformes des TRs sur l'élément de réponse négatif TSH α . a) Les valeurs obtenues sont représentées en activité relative, i.e. par comparaison avec la valeur du vecteur vide en absence de T₃. b) Les valeurs obtenues sont représentées en amplitude de répression de l'isoforme en présence de T₃.

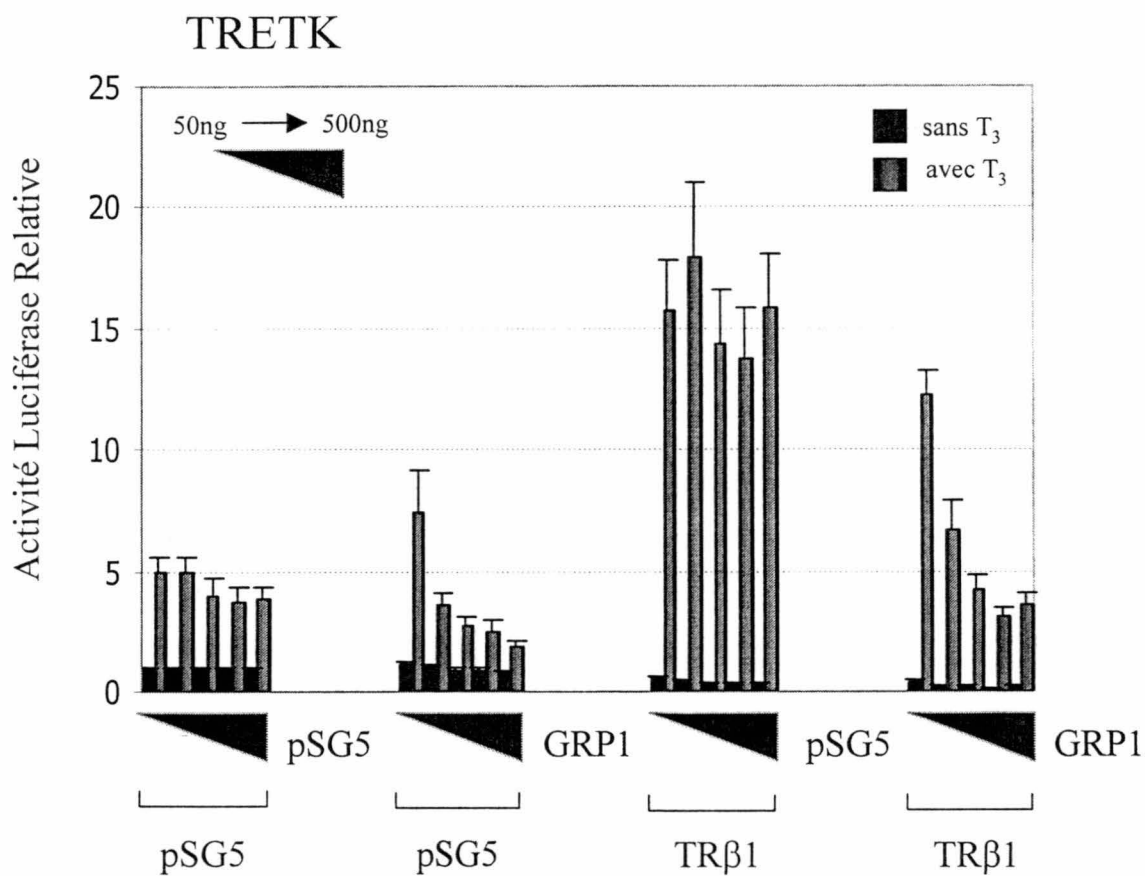


Figure 26. L'activité transcriptionnelle de TRβ1 diminue de façon graduelle en présence d'une dose croissante de GRP1. Dans ces essais, toutes les concentrations en ADN ont été normalisées avec le vecteur vide pSG5. Le pTRE TRETK fut utilisé dans ces expériences. Les valeurs sont représentées sous forme d'activité relative, comparées à la valeur du vecteur vide de concentration équivalente, en absence de T₃.

6. EFFET DE GRP1 SUR L'INTERACTION ENTRE LES TR ET LES TRES

Après l'étude de ces résultats, une hypothèse plausible était que GRP1, en se liant au domaine de liaison à l'ADN des TRs, les empêchait d'effectuer leur action en séquestrant les récepteurs hors de leur site d'action connu. Nous avons donc utilisé la technique de rétention sur gel, qui permet de mesurer l'interaction ADN-protéines, afin de vérifier si GRP1 empêchait la liaison de l'homodimère ou de l'hétérodimère sur l'ADN. On observe d'abord à la figure 27, que ni GRP1, ni RXR seuls ne lient le TRE DR+4. En absence de GRP1, TR β 1 lie le TRE sous forme d'homodimère, et la présence de l'hétérodimère TR-RXR est visualisé après l'addition de RXR α . La présence d'une bande non spécifique est due aux protéines du lysat qui reconnaissent l'élément de réponse. On constate ensuite que l'addition de GRP1 n'entraîne pas la formation de complexes supplémentaires et qu'une concentration croissante de GRP1 amène plutôt la diminution de la liaison de l'homodimère TR-TR sur le pTRE. La liaison de l'hétérodimère TR β 1-RXR α ne semble toutefois pas être affectée par la présence de la protéine dans cet essai. Ces résultats suggèrent donc que GRP1 diminue la liaison de l'homodimère à l'ADN et ne formerait pas de complexes avec les récepteurs sur l'ADN.

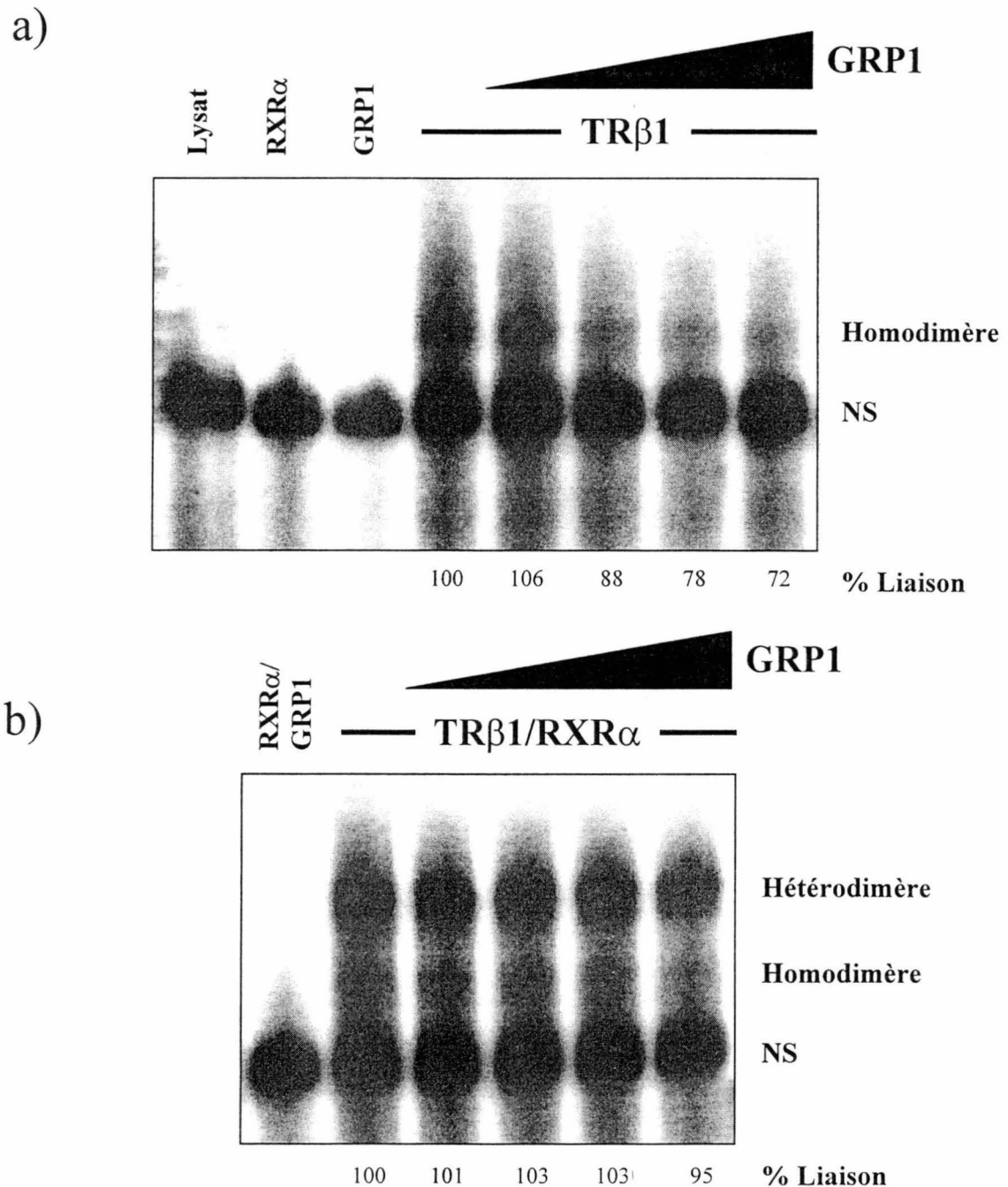


Figure 27. La formation d'un homodimère diminue graduellement suite à l'ajout d'une quantité croissante de GRP1. a) La quantité croissante de GRP1 entraîne la diminution graduelle de l'homodimère TR-TR sur l'ADN. Le pourcentage de liaison est mesuré par densitométrie où 100% correspond à l'homodimère TR-TR en absence de GRP1. b) L'intensité de la liaison TR-RXR ne semble pas être modifiée par la présence de GRP1. 100% de liaison correspond à l'hétérodimère en absence de GRP1.

7. ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DE LA VOIE DE LA PI3K

Il a été montré dans plusieurs articles que la voie de la PI3K est impliquée dans la translocation de GRP1 à la membrane plasmique (figure 10), ce qui influence par le fait même son action sur ARF (Venkateswarlu et al., 1998). On a également vu que les TRs se lient à la sous-unité active de la kinase et l'active en présence d'HTs (Simoncini et al., 2000). Nous avons donc voulu vérifier s'il y avait un lien entre la modulation de l'activité transcriptionnelle des TRs en présence de GRP1 et la voie de transduction de cette enzyme. Nous avons utilisé des inhibiteurs directs de la PI3K, tels la wortmanine et le LY2940002, dans des essais transcriptionnels. A la figure 28a, on observe qu'en absence de wortmanine, GRP1 diminue l'activité transcriptionnelle de TR β 1 sur TRETk, comme décrit préalablement à la figure 22. L'ajout de wortmanine n'affecte aucunement l'action de GRP1 sur le récepteur. Les mêmes observations sont faites pour l'inhibiteur LY2940002 à la figure 28b. Ces travaux préliminaires n'ont été faits qu'une seule fois, on peut constater que la réponse des récepteurs sans traitement n'est pas aussi bonne que celle observée à la figure 22 et qu'ils ne reflètent pas totalement l'environnement cellulaire.

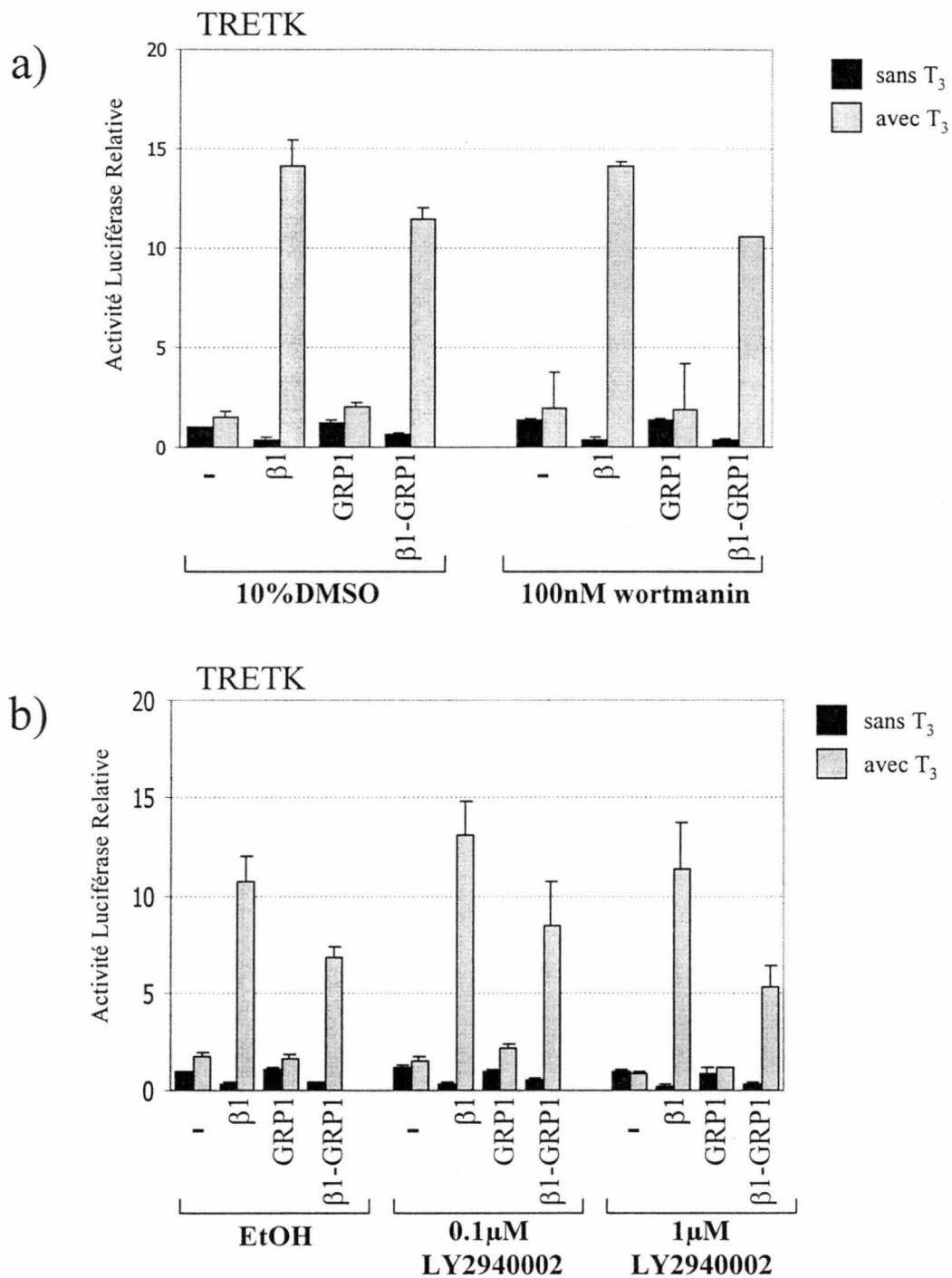


Figure 28. L' effet de GRP1 sur la transcription est indépendant de la voie de la PI3K. a) L'utilisation de 100nM de wortmanin n'influence pas l'action de GRP1 sur l'activité transcriptionnelle de TR β 1. **b)** L'utilisation de 0,1μM et 1μM de LY2940002 n'influencent pas l'activité transcriptionnelle de TR β 1.

IV. DISCUSSION

1. CARACTÉRISATION DE L'INTERACTION ENTRE GRP1 ET LES RÉCEPTEURS DES HORMONES THYROÏDIENNES

Les hormones thyroïdiennes (HT) sont essentielles au bon fonctionnement de nombreux tissus et organes. Les récepteurs des HTs (TRs) font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires. Ces protéines sont des facteurs de transcription qui modulent directement l'expression de gènes cibles. Par ailleurs, certaines actions rapides des HTs ne peuvent être expliquées par l'activité transcriptionnelle des TRs. Afin de mieux décrire les mécanismes d'action des HTs, nous avons criblé une banque d'ADNc à l'aide de la méthode double-hybride dans la levure et nous avons ainsi identifié de nouveaux partenaires protéiques aux TRs, dont GRP1. GRP1 est un facteur d'échange nucléotidique pour ARF et la caractérisation de sa liaison avec les TRs constitue le sujet de l'étude présentée dans ce mémoire.

La caractérisation première de l'interaction entre GRP1 et les récepteurs des hormones thyroïdiennes a débuté par l'étude *in vitro* des sites d'interaction par « GST pull-down ». Nous avons en premier lieu confirmé l'interaction entre l'appât et GRP1 dans les levures et nous sommes les premiers à montrer une telle liaison entre cette protéine et un récepteur nucléaire. Nous avons d'abord déduit, à l'aide d'une construction de TR β 2 à laquelle les acides aminés 89 à 116 avaient été enlevés, que le domaine de liaison à l'ADN de TR β 2 était le site, du moins un des sites d'interaction

de GRP1. Une étude plus avancée sera nécessaire pour déterminer les acides aminés du DBD responsables de cette liaison. On sait qu'il existe plusieurs fonctions associées à cette région. D'une part, le 1^{er} doigt de zinc ainsi que sa boîte P sont essentiels pour la reconnaissance de l'élément de réponse (TRE) sur l'ADN par le récepteur. L'attachement de GRP1 à cet endroit pourrait inhiber la liaison du récepteur à l'ADN et ainsi diminuer son activité transcriptionnelle sur les gènes cibles. La diminution globale de tous les taux transcriptionnels observée pour les trois isoformes des TRs indique que cette hypothèse est plausible. De plus, nous avons montré que la liaison de l'homodimère TR β 1-TR β 1 sur le pTRE DR+4 diminuait graduellement avec une concentration croissante de GRP1. Ces résultats concordent donc avec la possibilité qu'une liaison du 1^{er} doigt de zinc du récepteur puisse inhiber sa liaison à l'ADN.

D'autre part, la boîte D du DBD, localisée à la suite du 2^e doigt de zinc, est principalement impliquée dans la dimérisation du récepteur. Une liaison de GRP1 à cet endroit inhiberait la formation d'un dimère sur l'ADN. On observe cette situation dans le cas des homodimères; cependant, GRP1 semble n'avoir aucun effet apparent sur la formation d'un hétérodimère TR β 1-RXR α sur le pTRE DR+4, et ce, même à une très forte concentration de la protéine. Ceci pourrait être dû à une liaison plus forte de l'hétérodimère à l'ADN que celle de l'homodimère. Sachant que la formation de dimères stimule l'activité des récepteurs, on aurait également pu s'attendre à une diminution globale de tous les taux transcriptionnels. En fait, nous avons constaté que l'effet de GRP1 sur un élément de réponse négatif et positif était semblable, en

absence ou en présence de RXR α . Ces résultats suggèrent donc qu'une diminution de la dimérisation des récepteurs ne semble pas être le rôle principal de la liaison de GRP1 aux TRs. Une étude approfondie du site de liaison de GRP1 sur le TR-DBD sera donc nécessaire pour identifier les différents aspects reliés au récepteur qui sont modifiés par la liaison de ce nouveau partenaire protéique

Par ailleurs, depuis quelques années, l'identification de protéines interagissant avec le DBD des récepteurs nucléaires est de plus en plus décrite. L'histone acétylase PCAF est un des premiers coactivateurs à avoir été identifié pour interagir avec le DBD des récepteurs nucléaires en présence du ligand (Blanco et al., 1998). Dans un article paru en avril 2001 (Mathur et al., 2001), un groupe de chercheurs a identifié deux protéines interagissant avec le DBD de TR et de RXR, dont la protéine PSF (*polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor*). Cette dernière est un co-répresseur reconnaissant également Sin3A, qui à son tour recrute des protéines possédant une activité déacétylase (HDAC). PSF, identifiée initialement pour son rôle dans l'épissage des ARNm, semble faire partie d'un complexe co-répresseur entraînant un remodelage de la chromatine. D'autre part, la protéine « HIV Type 1 Tat Binding protein-1 » a également été identifiée comme partenaire d'interaction des TRs au niveau du DBD, mais contrairement à PSF, celle-ci est un coactivateur spécifique pour le récepteur, n'ayant aucun effet sur la fonction de RAR, RXR, PPAR γ et ER (Ishizuka et al., 2001). Finalement, lors du congrès de l'« Endocrine Society » en 2001, plusieurs équipes ont présenté des travaux portant sur l'identification de protéines interagissant avec cette région pour différents récepteurs.

En conclusion, il y a quelques années, l'identification d'une protéine interagissant avec le domaine de liaison à l'ADN de récepteurs nucléaires aurait été très surprenante. En 2001, plusieurs protéines reconnaissant cette région ont été identifiées, indiquant qu'elles ont le pouvoir de moduler la réponse des récepteurs de diverses façons.

Le domaine de liaison à l'ADN est une portion qui est très bien conservée chez tous les récepteurs nucléaires. Nous n'avons donc pas été étonnés de constater que GRP1 reconnaît toutes les isoformes des TRs, mais également très fortement le récepteur ER α . Cependant, GRP1 interagit très faiblement avec RXR α et ne lie pas de façon perceptible le RAR α , les seuls autres récepteurs étudiés. Il sera intéressant d'effectuer d'autres essais pour confirmer ces résultats, mais il est possible que la séquence d'acides aminés reconnue chez les TRs par GRP1 ne soit pas entièrement présente chez les récepteurs de la vitamine A. Cependant, si nous comparons la séquence des domaines de liaison à l'ADN des TR, RAR, RXR et ER, les acides aminés homologues entre TR et ER, sont, à quelques exceptions près, identiques également chez les récepteurs RAR et RXR. Une autre possibilité serait que GRP1 reconnaisse, en plus du DBD, d'autres portions protéiques ou une conformation tertiaire particulière des récepteurs nucléaires. Cette hypothèse pourrait expliquer que GRP1 interagit très faiblement avec le RXR α , *via* son DBD, mais le récepteur pourrait ne pas posséder des régions essentielles à une interaction complète entre les deux protéines. Par ailleurs, on dénote une certaine diminution de l'intensité de l'interaction entre la construction TR β 2(Δ 89-116) et GRP1 en la comparant avec

TR β 2wt. Cette observation concorde avec l'idée qu'il existe possiblement des sites multiples d'interaction entre ces protéines, autres que le DBD.

D'autre part, suite à ces résultats, nous pouvons nous interroger sur la spécificité de la réponse physiologique de l'interaction entre GRP1 et les TRs. Il existe de nombreux exemples de réactions croisées entre les TRs et différents RNs, et en particulier celui des œstrogènes. Deux articles récents montrent en effet que les gènes codant pour la préproenkephaline (Zhu et al., 2001) et le récepteur à l'ocytocine (Vasudevan et al., 2001) sont tous deux régulés par les œstrogènes, mais que leur action peut être modulée par les récepteurs des hormones thyroïdiennes. On sait par ailleurs que les TRs reconnaissent les éléments de réponse aux oestrogènes (ERE), mais la liaison à cette séquence d'ADN ne serait pas le seul moyen d'inhiber l'action des ERs : la séquestration de corégulateurs a également été observée, plusieurs de ces protéines étant partagées entre les différents RNs (Vasudevan et al., 2001). De plus, à l'instar des hormones thyroïdiennes, les oestrogènes possèdent également des actions non-génomiques peu expliquées, notamment une action neuronale similaire à celle des HTs. Il est donc probable que les TRs et les ERs interagissent tous les deux avec GRP1, de façon indépendante ou même synergique.

On a repêché initialement GRP1 par sa portion carboxy-terminale, le clone original étant composé du domaine PH et de la région polybasique. Cette portion, dans nos essais d'interaction, est également celle qui interagit le plus fortement avec le récepteur. Le domaine PH de GRP1 a la particularité de lier fortement le PIP3.

Cette action est potentialisée chez cytohesine-1, une protéine de la même famille que GRP1, par sa région polybasique (Dierks et al., 2001). Il sera pertinent de détailler, dans le futur, les acides aminés de GRP1 nécessaires à la liaison des TRs, ce qui pourra orienter davantage l'étude de la fonction physiologique de cette nouvelle interaction. Bien que la plupart des protéines possédant un domaine PH lient les phosphoinositides, d'autres ligands de cette région ont également été décrits, tels la sous-unité $\beta\gamma$ de protéines G hétérotrimériques (Touhara et al., 1994), l'actine (Yao et al., 1999) ainsi que la protéine kinase C (Yao et al., 1994). Il est donc plausible que cette portion de GRP1 puisse reconnaître des molécules protéiques, en plus de molécules lipidiques.

En ce qui concerne GRP1, c'est la première fois qu'on identifie une protéine interagissant avec sa portion carboxy-terminale : son domaine Sec7 reconnaît les protéines ARF et sa région hélicoïdale a récemment été décrite pour interagir avec deux protéines qui auraient un rôle d'échaffaudage. On sait que le domaine PH de GRP1 est essentiel à sa translocation membranaire par sa liaison au PIP3. Son action sur les petites protéines G ARFs dépendrait également de cette interaction aux phosphoinositides membranaires. Nos résultats suggèrent plusieurs possibilités. D'abord, les TRs pourraient lier partiellement le domaine PH de GRP1, sans empêcher la liaison de la protéine au PIP3 et ainsi, les récepteurs seraient transloqués à la membrane plasmique où une action non-génomique serait envisagée (figure 29). D'autre part, si les TRs bloquent entièrement la liaison de GRP1 aux phosphoinositides et empêchent la protéine de se diriger à la membrane, on pourrait

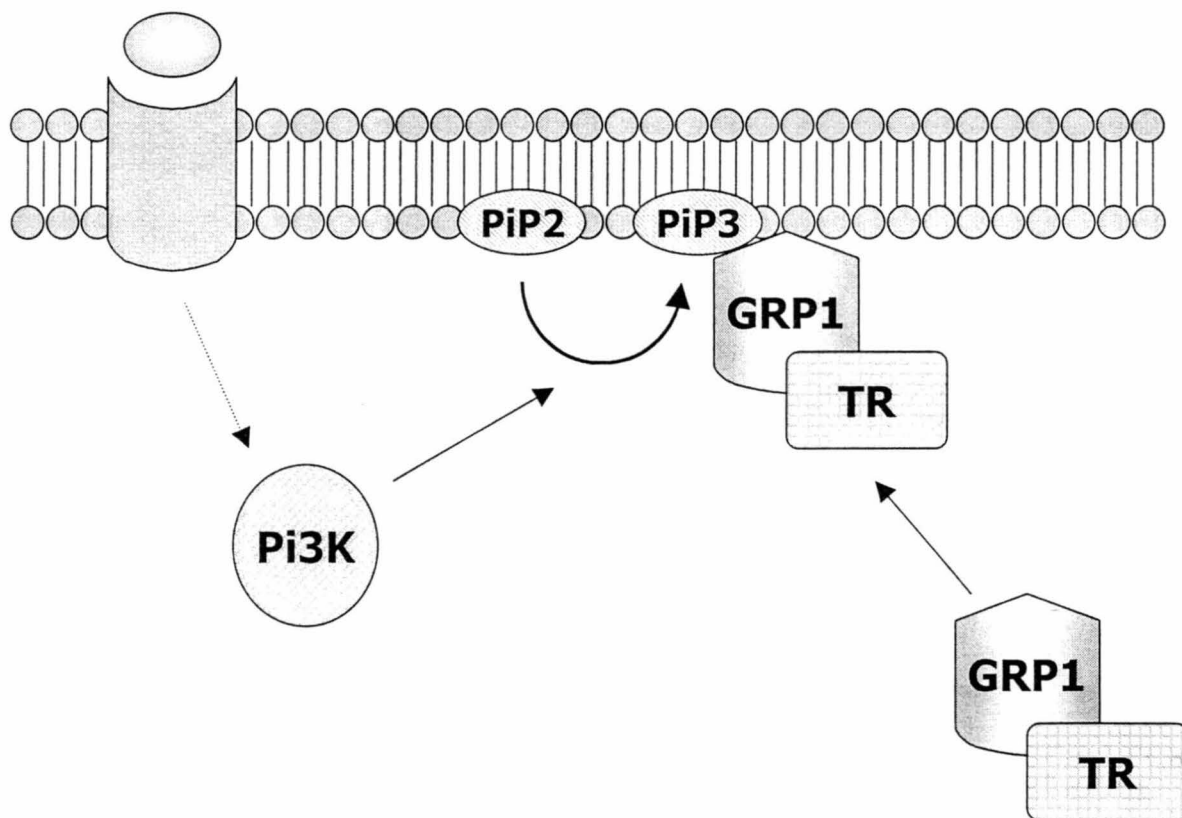


Figure 29. Modèle de translocation des TRs à la membrane plasmique.
 L'activation de l'enzyme PI3K entraîne la formation de PIP3 à partir du PIP2 membranaire. Le domaine PH de GRP1 reconnaissant avec une grande affinité le PIP3, la protéine sera dirigée du cytoplasme à la membrane. Les TRs pourraient également être transportés à la membrane, GRP1 agissant à titre de protéine chaperonne.

considérer une série de nouvelles fonctions qui n'auraient pas été démontrées jusqu'à présent.

Finalement, nos essais d'interaction démontrent que TR β 2 semble se lier à plusieurs portions de GRP1, avec cependant une plus faible affinité que pour la portion carboxy-terminale (figure 18). Ce n'est pas la première fois que des sites d'interaction multiples nous sont démontrés entre deux protéines. Ainsi, le corépresseur SMRT se lie à deux endroits sur TR β 2 (Yang et al., 1999). Il a aussi été montré pour les récepteurs aux androgènes que le coactivateur FHL2, qui possède quatre domaines LIM et demi, interagit avec le récepteur entier (Muller et al., 2000). De multiples constructions ont effectivement montré que l'intégrité du coactivateur participait à l'interaction avec le récepteur nucléaire. En fait, il ne faut pas oublier que dans un essai d'interaction *in vitro*, on utilise parfois une petite portion d'une protéine qui est fusionnée à la GST et qui ne possède pas nécessairement sa conformation native. On peut alors favoriser des interactions non physiologiques, d'où la nécessité d'étudier également ces complexes *in vivo*. D'autre part, des régions éloignées d'une protéine peuvent également se retrouver très près l'une de l'autre dans une conformation tertiaire. Il n'est donc pas étonnant d'observer la liaison entre TR β 2 et le domaine hélicoïdal de GRP1, mais nos essais d'interaction ainsi que le fait d'avoir initialement isolé cette portion semblent indiquer que la région carboxy-terminale de GRP1 serait davantage impliquée dans cette nouvelle interaction.

La plupart des corégulateurs connus ont une préférence marquée pour la conformation liée ou non liée des récepteurs nucléaires. Par exemple, les corépresseurs N-CoR et SMRT ne reconnaissent que les récepteurs non liés, alors que les coactivateurs GRIP1 et SRC-1 ne sont recrutés qu'en présence du ligand. Nous avons montré à la figure 19 que GRP1 pouvait interagir avec TR β 2 en absence ou en présence de T₃. Évidemment, on ne peut déduire de ces résultats que les HTs n'affectent pas l'activité de l'une ou l'autre de ces protéines. Bien que le lien entre les deux ne semble pas modifié par la présence ou non de l'hormone, il peut tout de même y avoir un effet fonctionnel important des HTs sur la fonction de cette interaction. On observe d'autres exemples dans la littérature d'interactions semblables. D'abord, un des mécanismes d'action des corégulateurs est d'interagir directement avec les protéines de la machinerie transcriptionnelle. Dans ce sens, il a été montré que TFIIB fait partie à la fois du complexe de corépresseurs et coactivateurs. Dans un premier temps, il serait séquestré par les TRs pour empêcher la formation du complexe initiateur de la transcription et d'autre part, cette liaison pourrait favoriser le recrutement d'autres protéines de la machinerie transcriptionnelle en présence de l'hormone. Un second exemple est celui de la protéine de la matrice nucléaire HET/SAF-B qui interagit avec le récepteur des œstrogènes en absence ou en présence d'estradiol, et ce, au niveau de son domaine de liaison à l'ADN (Oesterreich et al., 2000). Le rôle de HET-SAF-B serait de potentialiser l'action de l'antagoniste tamoxifène sur le récepteur. Le nouveau corépresseur PSF est également un autre exemple qui montre bien que la liaison du ligand n'affecte pas l'interaction entre la protéine et le TR, mais influence la répression transcriptionnelle par le récepteur en

absence de T₃ (Mathur et al., 2001). Bref, il est fort possible que la liaison de GRP1 aux TRs soit indépendante de la présence de T₃, mais que la fonction physiologique du complexe soit influencée par les HTs. Des études *in vivo* pourront confirmer cette hypothèse.

2. EXPRESSION CELLULAIRE ET TISSULAIRE DE GRP1

L'hybridation d'un « dot blot » commercial, utilisant la l'ADNc complet de GRP1 pour sonde, nous a montré que cette protéine était exprimée dans plusieurs tissus et lignées cellulaires humaines. Il a été cité dans un article qu'ARNO et cytohésine-1, des protéines possédant une très forte homologie avec GRP1, étaient exprimés de façon ubiquitaire, alors que GRP1 semblait absente du foie, du thymus et des lymphocytes circulants (Franco et al., 1998). Malheureusement, aucune figure de « Northern blot » dans cet article ne prouve cette affirmation. Cependant, si nous observons attentivement nos propres résultats, nous constatons que l'expression dans ces tissus est effectivement plus faible que celle de la majorité des échantillons. Lors de l'achat de la membrane, nous avons opté pour un « dot blot », plutôt qu'un « Northern blot » parce que nous pouvions cribler un plus grand nombre de tissus. Cependant, nous pouvons observer que la même sonde utilisée dans notre « Northern blot » reconnaît très bien l'ARNm de 4,5kb de GRP1, mais également des ARNm de plus petites tailles, qui pourraient correspondre aux ARNm de ARNO et cytohésine-1, des protéines 80% homologue à GRP1. Il est donc fort possible qu'il y ait une réaction croisée lors de l'hybridation du « Dot blot » qui s'expliquerait par la forte

homologie entre les séquences de ces trois protéines. Ceci dit, nous croyons fort bien que GRP1 et les différentes isoformes des TRs sont coexprimés dans la plupart des tissus humains et que l'interaction entre les deux protéines n'est pas que le produit d'un criblage *in vitro*.

3. EFFET DE GRP1 SUR L'ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DES TRs

Les récepteurs des hormones thyroïdiennes étant d'abord des facteurs de transcription, nous avons rapidement voulu vérifier l'effet de GRP1 sur leur activité transcriptionnelle. Nous avons alors constaté que l'addition de GRP1 dans nos essais entraîne la diminution générale de l'activité transcriptionnelle de toutes les isoformes des TRs, et ce, en régulation négative et positive, comme discuté précédemment. Par ailleurs, étant donné le lien étroit entre la voie de la PI3K et le rôle de GRP1 dans son action sur les protéines ARFs (figure 10), nous avons été surpris de constater, à la lumière de nos résultats préliminaires, que l'inhibition de cette voie n'affectait pas l'action de GRP1 sur l'activité transcriptionnelle de TR β 1. D'une part, il est possible que la surexpression de GRP1 et des TRs dans les cellules masque l'action physiologique de la PI3K sur ce nouveau complexe ; d'autre part, il est également probable que cette voie ne soit pas impliquée dans les effets transcriptionnels de GRP1, mais seulement dans la translocation probable des TRs à la membrane plasmique *via* GRP1 (figure 29). Enfin, il est possible que le modèle cellulaire utilisé ne soit pas adéquat pour l'étude de cette enzyme.

4. HYPOTHÈSES GÉNÉRALES

À la lumière de tous les résultats obtenus, plusieurs hypothèses sur la fonction de l'interaction entre les TRs et GRP1 s'offrent à nous. Nous avons vu que i) le domaine de liaison à l'ADN des TRs interagissait fortement avec le domaine PH de GRP1, ii) GRP1 reconnaissait toutes les isoformes des TRs et aussi le récepteur des œstrogènes, iii) la liaison des deux protéines était indépendante de la présence du ligand, iv) GRP1 entraînait une diminution de l'activité transcriptionnelle des TRs ainsi que de la liaison de l'homodimère à l'ADN et v) des inhibiteurs de PI3K n'affectaient pas l'effet de GRP1 sur l'activité transcriptionnelle des TRs. Nous sommes donc en présence de deux protagonistes avec lesquels trois avenues générales sont possibles. D'abord, on a vu que GRP1 pouvait influencer l'activité génomique des TRs, mais des actions non génomiques sont également possibles. En second lieu, les TRs pourraient prendre part à l'action de GRP1 sur les protéines ARFs, entre autres au niveau du cytosquelette qui est une cible reconnue des HTs. Finalement, nous sommes en présence d'un nouveau complexe qui pourrait également posséder de nouvelles fonctions, possiblement éloignées des rôles connus des TRs et de GRP1.

D'abord si nous considérons que GRP1 joue un rôle dans l'action des TRs, il faut prendre en compte à la fois les mécanismes génomiques et non génomiques. L'effet observé en transcription n'est peut-être en fait que le reflet d'une séquestration cytoplasmique des TRs pour les amener à une action non nucléaire. Cependant, deux hypothèses subsistent pour expliquer le rôle possible de GRP1 sur l'activité

transcriptionnelle des TRs. D'une part, la liaison du facteur d'échange pourrait inhiber une réponse exagérée aux hormones thyroïdiennes en empêchant le récepteur de se lier à l'ADN. Il existe cependant de nombreux facteurs qui régulent finement la réponse génomique aux HTs de façon spécifique et il serait difficile de concevoir que GRP1 puisse interagir aléatoirement avec les TRs pour simplement empêcher leur liaison sur un TRE. D'autre part, sachant que l'environnement protéique d'un récepteur nucléaire influence énormément sa réponse transcriptionnelle, il est possible que les cellules rénales de singe, les CV-1, ne possèdent pas tous les éléments nécessaires à GRP1 pour effectuer son action physiologique. Pour évaluer cette hypothèse, nous pourrions utiliser des lignées cellulaires humaines ou transfecter des partenaires protéiques connus de GRP1 et TR, et vérifier les conséquences transcriptionnelles.

La participation de GRP1 à des actions non-génomiques des HTs est une hypothèse très pertinente à évaluer. D'une part, on sait que GRP1 est impliquée dans la formation d'ondulations membranaires ou « ruffles » par ARF6 ; ce qui est la conséquence d'un remodelage du cytosquelette d'actine cortical. Cette action aurait comme fonction de favoriser la formation vésiculaire d'endosomes. Une étude a également montré que la surexpression de la protéine ARNO, homologue à 80% à GRP1, amène le désassemblage des fibres de stress d'actine. La région carboxy-terminale de ARNO est nécessaire à cette action, et les auteurs de cette étude suggèrent un lien direct entre ARNO, les récepteurs à la surface de la cellule, ARF6 et le cytosquelette d'actine (Frank et al., 1998). D'autre part, les HTs sont essentielles à

la croissance et aux embranchements neuronaux, et cette action est réalisée entre autres par un effet sur le cytosquelette d'actine de ces neurones, dans la région du cône de croissance. Cette action est rapide et ne nécessite pas une synthèse protéique *de novo*. L'implication des récepteurs nucléaires aux HTs n'a jamais été montrée. Par contre, quelques études ont montré la présence des TRs au cytoplasme, avant leur translocation au noyau après une exposition aux HTs (Zhu et al., 1998). Il serait donc plausible d'associer le remodelage du cytosquelette d'actine causé par les HTs à une action non-génomique reliée à la présence des TRs dans le cytoplasme. L'interaction avec la protéine GRP1 pourrait être le lien entre les TRs et les protéines impliquées avec le réarrangement de l'actine.

L'enzyme PI3K pourrait également s'avérer être un lien des plus intéressants entre les deux protéines. En effet, on sait que la production de PIP3 suite à l'activation de la PI3K est essentielle à la translocation de GRP1 à la membrane plasmique et permet ainsi son action sur la petite protéine G : ARF (figure 10). Par ailleurs, il a été montré récemment que les TRs interagissent directement avec la sous-unité régulatrice p85 α de l'enzyme PI3K et que les HTs l'activaient, d'où la production de PIP3 observée (Simoncini et al., 2000). Ainsi, en activant la PI3K, les HTs activent aussi indirectement GRP1. L'interaction physique entre TR et GRP1 pourrait être nécessaire à cette activité afin d'obtenir une réponse locale des protéines ARFs. Ceci constituerait une voie interne d'activation des protéines ARFs et pourrait impliquer à la fois des fonctions associées aux HTs ou aux protéines ARFs elle-mêmes.

Finalement, c'est la première fois qu'on observe une interaction entre GRP1, ou les membres de sa famille, et un récepteur nucléaire. On peut tenter d'associer cette interaction à des rôles déjà connus, mais non élucidés pour ces deux partenaires, mais il est également probable que de nouvelles fonctions non prévisibles soient associées à cette nouvelle interaction. Nous avons effectivement montré que GRP1 reconnaissait le DBD des TRs et empêche leur liaison à l'ADN et que les TRs semblaient lier le domaine PH et polybasique de GRP1 avec une forte affinité, modifiant possiblement la liaison de la protéine au PIP3. Cette hypothèse ne peut être négligée et il est possible que nous découvriions éventuellement de nouvelles réponses à certaines énigmes non résolues.

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La découverte d'un nouveau partenaire d'interaction pour les récepteurs des hormones thyroïdiennes nous mène vers différentes pistes. La liaison de GRP1, une protéine cytoplasmique et membranaire, aux récepteurs des hormones thyroïdiennes, principalement nucléaires, était d'abord surprenante. Des études chez la levure ainsi que des essais d'interaction *in vitro* nous ont confirmé cette liaison. Nous avons ensuite montré que le domaine de liaison à l'ADN des TRs ainsi que la région carboxy-terminale de GRP1 étaient importants pour cette interaction, suggérant peut-être de nouvelles fonctions à ces deux régions. Les récepteurs des œstrogènes semblent également être une cible de GRP1, alors que les récepteurs de l'acide rétinoïque interagissent faiblement ou pas du tout avec cette protéine. Les hormones thyroïdiennes et les œstrogènes possédant des actions non génomiques semblables, il est possible que GRP1 soit un lien entre des mécanismes d'action communs de ces hormones. D'autre part, nous avons montré que GRP1 entraînait la diminution globale des taux transcriptionnels de toutes les isoformes des TRs, sur un élément de réponse positif et négatif. La diminution de la liaison de l'homodimère TR-TR sur l'ADN en présence de GRP1 nous indique que la séquestration des récepteurs par cette protéine pourrait être la cause des observations effectuées en transcription.

À cette étape de caractérisation de l'interaction entre GRP1 et les TRs, plusieurs hypothèses s'offrent à nous. Afin d'élucider davantage la fonction physiologique de ce nouveau complexe, les travaux futurs seront orientés vers des

études *in vivo*. Nous souhaitons confirmer cette interaction dans les cellules par co-immunoprécipitation et par l'utilisation de protéines fluorescentes fusionnées aux protéines d'intérêts dans la méthode de « *fluorescence resonance energy transfer* » (FRET). La séquestration et la translocation des TRs et de GRP1 pourront également être observées à l'aide de ces étiquettes fluorescentes, en absence ou en présence d'HTs. Une étiquette Myc pourra aussi être utilisée pour procéder à des études d'immunofluorescence ainsi qu'à des essais d'immunoprécipitation. Étant donné l'hypothèse du rôle de GRP1 dans le réarrangement du cytosquelette d'actine par les HTs, comme décrit à la section 5 de la « Discussion », nous voulons étudier i) l'effet de la T₃ et des TRs sur la translocation de GRP1 à la membrane plasmique et ii) le cytosquelette d'actine de cellules neuronales et ses protéines associées après cotransfection des TRs et de GRP1 suite à un traitement aux HTs. Les cellules neuronales PC12, des phéochromocytomes, seront utilisées comme modèle étant donné qu'elles expriment faiblement les isoformes actives des TRs et que leur particularités morphologiques ont déjà été étudiées dans cette optique (Munoz et al., 1993). Finalement, des études approfondies seront planifiées pour déterminer le rôle exact de GRP1 dans l'activité transcriptionnelle des TRs et l'importance de la région polybasique dans l'interaction sera également évaluée. Bref, beaucoup de travaux restent à faire afin de déterminer les conséquences physiologiques de cette interaction entre GRP1 et les récepteurs des hormones thyroïdiennes.

VI. REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier Dr Marie-France Langlois pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir proposé un projet de recherche des plus intéressant. Ton dynamisme face à nos projets a souvent été une grande source de motivation lors de semaines plus difficiles. Un grand merci également pour m'avoir accompagnée lors de mon tout premier vol d'avion, mais surtout de m'avoir poussé à présenter en français, en anglais, au Québec ou ailleurs, ce sont des acquis indéniables.

Un gros merci à Dr Liette Laflamme, une personne pleine de ressources et de connaissances qui est devenue une bonne amie. Partager des expériences, discuter résultats et « troubleshooting », s'énervé pour un clonage réussi ou aller se chercher un café parce que plus rien ne fonctionne, sont des petits plaisirs quotidiens qui rendent tellement plus agréable le travail au laboratoire.

Merci à Danièle et au pré-docteur Maltais. On a vécu notre maîtrise au même rythme, on a eu des cours ensemble, on s'est supporté lors de nos séminaires, on a eu de belles discussions, des fou-rires, des accrochages aussi, mais je pense qu'on formait une belle gang et c'est toujours très agréable de vous côtoyer. Merci à Marie-Belle et aux autres stagiaires qui ont passé au laboratoire, entre autres Pierre-Luc et Marie-Ève, pour votre aide dans l'avancement du projet.

J'aimerais ensuite remercier mes parents, Jacques et Denise, qui m'encouragent et me supportent depuis bien des années déjà. Merci à Éric, Sandra et leur petit Tristan, le plus beau bébé du monde... pour l'instant! Un beau merci à mon copain Simon qui a su m'épauler au cours de cette dernière année.

Finalement, merci aux Drs Marie-France Langlois, Nicole Gallo-Payet et Guylain Boissonneault d'avoir accepté de corriger et d'évaluer ce mémoire.

VIII. RÉFÉRENCES

- Abel, E. D., R. S. Ahima, et al. (2001). Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. J Clin Invest **107**(8): 1017-23.
- Aniello, F., D. Couchie, et al. (1991). Regulation of five tubulin isotypes by thyroid hormone during brain development. J Neurochem **57**(5): 1781-6.
- Baniahmad, A., I. Ha, et al. (1993). Interaction of human thyroid hormone receptor beta with transcription factor TFIIB may mediate target gene derepression and activation by thyroid hormone. Proc Natl Acad Sci U S A **90**(19): 8832-6.
- Benjamin, S., M. A. Cambray-Deakin, et al. (1988). Effect of hypothyroidism on the expression of three microtubule-associated proteins (1A, 1B and 2) in developing rat cerebellum. Neuroscience **27**(3): 931-9.
- Black, B. E., J. M. Holaska, et al. (2001). DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. Curr Biol **11**(22): 1749-58.
- Blanco, J. C., S. Minucci, et al. (1998). The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. Genes Dev **12**(11): 1638-51.
- Chakravarti, D., V. J. LaMorte, et al. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. Nature **383**(6595): 99-103.
- Chardin, P., S. Paris, et al. (1996). A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. Nature **384**(6608): 481-4.
- Charriere-Bertrand, C. and J. Nunez (1992). Regulation of tubulin, Tau and microtubule associated protein 2 expression during mouse brain development. Neurochem Int **21**(4): 535-41.
- Chavrier, P. and B. Goud (1999). The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. Curr Opin Cell Biol **11**(4): 466-75.

Chen, J. D. and R. M. Evans (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. Nature **377**(6548): 454-7.

Clodi, M., P. Vollenweider, et al. (1998). Effects of general receptor for phosphoinositides 1 on insulin and insulin-like growth factor I-induced cytoskeletal rearrangement, glucose transporter-4 translocation, and deoxyribonucleic acid synthesis. Endocrinology **139**(12): 4984-90.

Collingwood, T. N., F. D. Urnov, et al. (2001). Chromatin remodeling by the thyroid hormone receptor in regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha-subunit promoter. J Biol Chem **276**(36): 34227-34.

Dai, G., O. Levy, et al. (1996). Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. Nature **379**(6564): 458-60.

Davis, P. J. and F. B. Davis (1996). Nongenomic actions of thyroid hormone. Thyroid **6**(5): 497-504.

Davis, P. J., A. Shih, et al. (2000). Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. J Biol Chem **275**(48): 38032-9.

Dierks, H., J. Kolanus, et al. (2001). Actin cytoskeletal association of cytohesin-1 is regulated by specific phosphorylation of its carboxyl-terminal polybasic domain. J Biol Chem **276**(40): 37472-81.

Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science **240**(4854): 889-95.

Farwell, A. P., M. P. Tranter, et al. (1995). Thyroxine-dependent regulation of integrin-laminin interactions in astrocytes. Endocrinology **136**(9): 3909-15.

Forman, B. M. and H. H. Samuels (1990). Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors: the regulatory zipper model. Mol Endocrinol **4**(9): 1293-301.

Franco, M., J. Boretto, et al. (1998). ARNO3, a Sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor 1, is involved in the control of Golgi structure and function. Proc Natl Acad Sci U S A **95**(17): 9926-31.

Frank, S. R., J. C. Hatfield, et al. (1998). Remodeling of the actin cytoskeleton is coordinately regulated by protein kinase C and the ADP-ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO. Mol Biol Cell **9**(11): 3133-46.

Fukui, Y., S. Ihara, et al. (1998). Downstream of phosphatidylinositol-3 kinase, a multifunctional signaling molecule, and its regulation in cell responses. J Biochem (Tokyo) **124**(1): 1-7.

Glass, C. K. (1996). Some new twists in the regulation of gene expression by thyroid hormone and retinoic acid receptors. J Endocrinol **150**(3): 349-57.

Greenspan, F. S. (1997). Basic and clinical endocrinology.

Hollenberg, A. N., T. Monden, et al. (1995). The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. Mol Endocrinol **9**(5): 540-50.

Horlein, A. J., A. M. Naar, et al. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. Nature **377**(6548): 397-404.

Hu, X. and M. A. Lazar (2000). Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. Trends Endocrinol Metab **11**(1): 6-10.

Idelman, S. (1995). Endocrinologie - Fondements Physiologiques. Grenoble, Collection Grenoble Sciences.

Ishizuka, T., T. Satoh, et al. (2001). Human immunodeficiency virus type 1 Tat binding protein-1 is a transcriptional coactivator specific for TR. Mol Endocrinol **15**(8): 1329-43.

- Jackson, C. L. and J. E. Casanova (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. Trends Cell Biol **10**(2): 60-7.
- Jackson, T. R., B. G. Kearns, et al. (2000). Cytohesins and centaurins: mediators of PI 3-kinase-regulated Arf signaling. Trends Biochem Sci **25**(10): 489-95.
- Jenster, G. (1998). Coactivators and corepressors as mediators of nuclear receptor function: an update. Mol Cell Endocrinol **143**(1-2): 1-7.
- Klarlund, J. K., J. Holik, et al. (2001). Signaling complexes of the ferm domain-containing protein grsp1 bound to arf exchange factor grp1. J Biol Chem **276**(43): 40065-70.
- Klarlund, J. K., L. E. Rameh, et al. (1998). Regulation of GRP1-catalyzed ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. J Biol Chem **273**(4): 1859-62.
- Klarlund, J. K., W. Tsiaras, et al. (2000). Distinct polyphosphoinositide binding selectivities for pleckstrin homology domains of GRP1-like proteins based on diglycine versus triglycine motifs. J Biol Chem **275**(42): 32816-21.
- Ko, L., G. R. Cardona, et al. (2002). Identification and Characterization of a Tissue-Specific Coactivator, GT198, That Interacts with the DNA-Binding Domains of Nuclear Receptors. Mol Cell Biol **22**(1): 357-369.
- Langille, S. E., V. Patki, et al. (1999). ADP-ribosylation factor 6 as a target of guanine nucleotide exchange factor GRP1. J Biol Chem **274**(38): 27099-104.
- Langlois, M. F., K. Zanger, et al. (1997). A unique role of the beta-2 thyroid hormone receptor isoform in negative regulation by thyroid hormone. Mapping of a novel amino- terminal domain important for ligand-independent activation. J Biol Chem **272**(40): 24927-33.
- Lazar, M. A. (1993). Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. Endocr Rev **14**(2): 184-93.

Lazar, M. A., T. J. Berrodin, et al. (1991). Differential DNA binding by monomeric, homodimeric, and potentially heteromeric forms of the thyroid hormone receptor. Mol Cell Biol **11**(10): 5005-15.

Lee, I. J., P. H. Driggers, et al. (1994). Recombinant thyroid hormone receptor and retinoid X receptor stimulate ligand-dependent transcription in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A **91**(5): 1647-51.

Lee, S. Y. and B. Pohajdak (2000). N-terminal targeting of guanine nucleotide exchange factors (GEF) for ADP ribosylation factors (ARF) to the Golgi. J Cell Sci **113**(Pt 11): 1883-9.

Leo, C. and J. D. Chen (2000). The SRC family of nuclear receptor coactivators. Gene **245**(1): 1-11.

Leonard, J. L. and A. P. Farwell (1997). Thyroid hormone-regulated actin polymerization in brain. Thyroid **7**(1): 147-51.

Li, Q. L., E. Jansen, et al. (2001). Regulation of prohormone convertase 1 (PC1) by thyroid hormone. Am J Physiol Endocrinol Metab **280**(1): E160-70.

Li, Q. L., E. Jansen, et al. (2000). Interactions between the prohormone convertase 2 promoter and the thyroid hormone receptor. Endocrinology **141**(9): 3256-66.

Lin, H. Y., F. B. Davis, et al. (1999). Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells. Am J Physiol **276**(5 Pt 1): C1014-24.

Lorenzo, P. I., C. Menard, et al. (2002). Thyroid Hormone-Dependent Regulation of Talpha1 alpha-Tubulin during Brain Development. Mol Cell Neurosci **19**(3): 333-43.

Mathur, M., P. W. Tucker, et al. (2001). PSF is a novel corepressor that mediates its effect through Sin3A and the DNA binding domain of nuclear hormone receptors. Mol Cell Biol **21**(7): 2298-311.

- Miyamoto, T., T. Kakizawa, et al. (2001). The role of hinge domain in heterodimerization and specific DNA recognition by nuclear receptors. Mol Cell Endocrinol **181**(1-2): 229-38.
- Motomura, K. and G. A. Brent (1998). Mechanisms of thyroid hormone action. Implications for the clinical manifestation of thyrotoxicosis. Endocrinol Metab Clin North Am **27**(1): 1-23.
- Muller, J. M., U. Isele, et al. (2000). FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. Embo J **19**(3): 359-69.
- Munoz, A., C. Wrighton, et al. (1993). Thyroid hormone receptor/c-erbA: control of commitment and differentiation in the neuronal/chromaffin progenitor line PC12. J Cell Biol **121**(2): 423-38.
- Nagy, L., H. Y. Kao, et al. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. Cell **89**(3): 373-80.
- Nan, X., H. H. Ng, et al. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. Nature **393**(6683): 386-9.
- Nevrivy, D. J., V. J. Peterson, et al. (2000). Interaction of GRASP, a protein encoded by a novel retinoic acid- induced gene, with members of the cytohesin family of guanine nucleotide exchange factors. J Biol Chem **275**(22): 16827-36.
- Nunez, J., D. Couchie, et al. (1991). Regulation by thyroid hormone of microtubule assembly and neuronal differentiation. Neurochem Res **16**(9): 975-82.
- Oatey, P. B., K. Venkateswarlu, et al. (1999). Confocal imaging of the subcellular distribution of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in insulin- and PDGF-stimulated 3T3-L1 adipocytes. Biochem J **344 Pt 2**: 511-8.
- Oesterreich, S., Q. Zhang, et al. (2000). Tamoxifen-bound estrogen receptor (ER) strongly interacts with the nuclear matrix protein HET/SAF-B, a novel inhibitor of ER-mediated transactivation. Mol Endocrinol **14**(3): 369-81.

Peyroche, A., S. Paris, et al. (1996). Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein. Nature **384**(6608): 479-81.

Rastinejad, F., T. Perlmann, et al. (1995). Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. Nature **375**(6528): 203-11.

Ribeiro, R. C., J. W. Apriletti, et al. (1998). Mechanisms of thyroid hormone action: insights from X-ray crystallographic and functional studies. Recent Prog Horm Res **53**: 351-92.

Roth, M. G. (1999). Snapshots of ARF1: implications for mechanisms of activation and inactivation. Cell **97**(2): 149-52.

Safer, J. D., M. F. Langlois, et al. (1997). Isoform variable action among thyroid hormone receptor mutants provides insight into pituitary resistance to thyroid hormone. Mol Endocrinol **11**(1): 16-26.

Sap, J., A. Munoz, et al. (1986). The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. Nature **324**(6098): 635-40.

Segal, J. and S. H. Ingbar (1989). 3,5,3'-Triiodothyronine increases cellular adenosine 3',5'- monophosphate concentration and sugar uptake in rat thymocytes by stimulating adenylate cyclase activity: studies with the adenylate cyclase inhibitor MDL 12330A. Endocrinology **124**(5): 2166-71.

Segal, J. and S. H. Ingbar (1989). Evidence that an increase in cytoplasmic calcium is the initiating event in certain plasma membrane-mediated responses to 3,5,3'-triiodothyronine in rat thymocytes. Endocrinology **124**(4): 1949-55.

Segal, J., M. C. Rehder, et al. (1986). Calmodulin mediates the stimulatory effect of 3,5,3'-triiodothyronine on adenylate cyclase activity in rat thymocyte plasma membranes. Endocrinology **119**(6): 2629-34.

Shih, A., H. Y. Lin, et al. (2001). Thyroid hormone promotes serine phosphorylation of p53 by mitogen- activated protein kinase. Biochemistry **40**(9): 2870-8.

Siegrist-Kaiser, C. A., C. Juge-Aubry, et al. (1990). Thyroxine-dependent modulation of actin polymerization in cultured astrocytes. A novel, extranuclear action of thyroid hormone. J Biol Chem **265**(9): 5296-302.

Simoncini, T., A. Hafezi-Moghadam, et al. (2000). Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. Nature **407**(6803): 538-41.

Sterling, K. and M. A. Brenner (1995). Thyroid hormone action: effect of triiodothyronine on mitochondrial adenine nucleotide translocase in vivo and in vitro. Metabolism **44**(2): 193-9.

Taylor, A. H. and F. Al-Azzawi (2000). Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. J Mol Endocrinol **24**(1): 145-55.

Thompson, C. C. and R. M. Evans (1989). Trans-activation by thyroid hormone receptors: functional parallels with steroid hormone receptors. Proc Natl Acad Sci U S A **86**(10): 3494-8.

Tone, Y., T. N. Collingwood, et al. (1994). Functional analysis of a transactivation domain in the thyroid hormone beta receptor. J Biol Chem **269**(49): 31157-61.

Touhara, K., J. Inglese, et al. (1994). Binding of G protein beta gamma-subunits to pleckstrin homology domains. J Biol Chem **269**(14): 10217-20.

Vasudevan, N., G. Davidkova, et al. (2001). Differential interaction of estrogen receptor and thyroid hormone receptor isoforms on the rat oxytocin receptor promoter leads to differences in transcriptional regulation. Neuroendocrinology **74**(5): 309-24.

Vasudevan, N., Y. S. Zhu, et al. (2001). Crosstalk between oestrogen receptors and thyroid hormone receptor isoforms results in differential regulation of the preproenkephalin gene. J Neuroendocrinol **13**(9): 779-90.

Venkateswarlu, K., F. Gunn-Moore, et al. (1998). Nerve growth factor- and epidermal growth factor-stimulated translocation of the ADP-ribosylation factor-exchange factor GRP1 to the plasma membrane of PC12 cells requires activation of

phosphatidylinositol 3-kinase and the GRP1 pleckstrin homology domain. Biochem J **335**(Pt 1): 139-46.

Weinberger, C., C. C. Thompson, et al. (1986). The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. Nature **324**(6098): 641-6.

Williams, G. R. (2000). Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. Mol Cell Biol **20**(22): 8329-42.

Wong, J., D. Patterton, et al. (1998). Distinct requirements for chromatin assembly in transcriptional repression by thyroid hormone receptor and histone deacetylase. Embo J **17**(2): 520-34.

Wrutniak, C., I. Cassar-Malek, et al. (1995). A 43-kDa protein related to c-Erb A alpha 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver. J Biol Chem **270**(27): 16347-54.

Wrutniak-Cabello, C., F. Casas, et al. (2001). Thyroid hormone action in mitochondria. J Mol Endocrinol **26**(1): 67-77.

Yang, Z., S. H. Hong, et al. (1999). Transcriptional anti-repression. Thyroid hormone receptor beta-2 recruits SMRT corepressor but interferes with subsequent assembly of a functional corepressor complex. J Biol Chem **274**(52): 37131-8.

Yao, L., P. Janmey, et al. (1999). Pleckstrin homology domains interact with filamentous actin. J Biol Chem **274**(28): 19752-61.

Yao, L., Y. Kawakami, et al. (1994). The pleckstrin homology domain of Bruton tyrosine kinase interacts with protein kinase C. Proc Natl Acad Sci U S A **91**(19): 9175-9.

Yen, P. M. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. Physiol Rev **81**(3): 1097-142.

Zhu, X. G., J. A. Hanover, et al. (1998). Hormone-induced translocation of thyroid hormone receptors in living cells visualized using a receptor green fluorescent protein chimera. J Biol Chem **273**(42): 27058-63.

Zhu, Y. S., L. Q. Cai, et al. (2001). Molecular analysis of estrogen induction of preproenkephalin gene expression and its modulation by thyroid hormones. Brain Res Mol Brain Res **91**(1-2): 23-33.